

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**UNIDAD DE POSTGRADO**

**Detección de metalobetalactamasas (MBLs) en  
Pseudomonas aeruginosa resistentes a los  
carbapenemas en un Hospital Nacional, en los meses de  
enero a octubre del año 2008**

**TESIS**

para optar el grado académico de Magíster en Microbiología

**AUTOR**

José Alberto Díaz Tello

**Lima – Perú**

**2008**

# **DEDICATORIAS**

**A mi padre que ya no está**

**JOSE MARIA DIAZ**

Por aquel corto y maravilloso tiempo que compartió conmigo, a quien le guardo un singular  
aprecio y estima personal por su gran responsabilidad asumida.

**A mi madre**

**TELESVINA TELLO**

Por su gran ayuda, cariño y comprensión; por motivarme a seguir siempre adelante y por su  
valioso ejemplo demostrado de independencia personal.

**A mi esposa**

**JUSTINA VEGA**

Compañera inseparable, por ayudarme a lograr mis objetivos, por su cariño y dedicación  
hacia mi persona.

**A mis hijos**

**ROXANITA, LOS PESPE, CRISTHIAN, MELISSITA**

La nueva generación, por la gran alegría que me dan cada día y por compartir momentos  
muy gratos y maravillosos.

# **AGRADECIMIENTOS**

## **A la Dra. Mirtha Roque Alcarraz**

Profesora Auxiliar a Tiempo Completo Directora del Centro de Control Analítico (CCA) del CENPOFARMA y Miembro del Comité Directivo de la Unidad de Post Grado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Marcos, por su apoyo en la realización de presente investigación.

## **Al Dr. Rafael Antonio Ramírez Ponce**

Médico Patólogo Clínico especialista en Microbiología Clínica, Jefe del Servicio de Microbiología del Departamento de Patología Clínica del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen ESSALUD, por sus enseñanzas, consejos, facilidades y ayuda en la realización de éste trabajo científico.

## **Al Personal del Servicio de Microbiología**

Al personal Profesional y no Profesional que laboran en el Servicio de Microbiología: Biólogos, Tecnólogos Médicos, Técnicos, Auxiliares, Digitadores; por su colaboración en la realización de esta investigación.

# INDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCION .....	1
OBJETIVO GENERAL:.....	2
OBJETIVOS ESPECIFICOS:.....	2
II. MARCO TEORICO .....	3
2.1 - Antecedentes.....	3
2.2 - Genero Pseudomonas.....	6
2.2.1 - Ubicación Taxonómica del Género Pseudomonas: .....	7
2.2.2 - Especies del Género Pseudomonas:.....	7
2.3 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
2.4 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistente(PAMR): .....	9
2.5 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Panrresistente ( PAPR):.....	10
2.6 - Mecanismos de resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	111
2.6.1 - $\beta$ -lactamasas: .....	122
2.6.2 - Bombas de Expulsión:.....	15
2.6.3 - Porinas de Membrana: .....	16
2.6.4 - Modificacion del Sitio Blanco: .....	166
2.7 - Carbapenamasas:.....	177
2.7.1 - Serino – Carbapenamasas: .....	177
2.7.2 - Metallo- Beta- Lactamasas MBLs ( MBLs): .....	188
2.8 - Carbapenemas: .....	20
2.9 – Monodiscos De Acido Etilendiamino Tetracético(EDTA): .....	21

<b>III. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>222</b>
3.1 Fuente de Información: .....	222
3.2 Cepas Bacterianas: .....	22
3.3 Agentes Antimicrobianos: .....	233
3.4 Susceptibilidad Antibiótica: .....	233
3.5 Monodiscos de EDTA: .....	244
3.6 Detección de la Metallo B- Lactamasas: .....	244
3.6.1 Preparación del medio Mueller Hinton: .....	244
3.6.2 Rehabilitación de las Cepas de <i>Pseudomonas</i> : .....	244
3.6.3 Preparación del Inoculo: .....	244
3.6.4 Inoculación de las Placas: .....	255
3.6.5 Método de Detección de Metallo B- lactamasas empleando Discos de EDTA.....	255
3.6.6 Lectura de las placas e Interpretación de los Resultados: .....	256
3.6.7 Conservación de Cepas Positivas: .....	266
3.7 Procesamiento y Análisis de Datos: .....	266
3.7.1 Procesamiento de Datos: .....	266
3.7.2 Análisis Estadístico: .....	266
3.7.3 Presentación de Cuadros y Gráficos: .....	266
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>277</b>
<b>V. DISCUSION .....</b>	<b>399</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>422</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA: .....</b>	<b>433</b>
<b>APENDICE .....</b>	<b>499</b>

## RESUMEN

Del mes de enero al mes de octubre del año 2008 en el Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen – ESSALUD, se colectaron 186 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes al Imipenem (IMP) y al Meropenem (MEM) o con resistencia Intermedia a los dos antibióticos o a uno de ellos.

Utilizando el Método Fenotípico de Doble Difusión en Disco con Monodiscos de EDTA; se llegó a detectar 13 cepas de *P. aeruginosa* positivas para MBLs, correspondiente al 6.99 % de las cepas testadas; de las cuales, el 53.84 % de la sinergia (efecto de la metaloenzima) se manifestó en el disco de Meropenem, el 30.75 % se manifestó en ambos discos (Imipenem y Meropenem) y solo el 15.38 % se manifestó en el disco de Imipenem.

El 100 % de cepas de *P. aeruginosa* en las que se detectó las metaloenzimas provinieron de pacientes hospitalizados, de estos aislados el 69.76 % correspondieron al sexo masculino; el 61.53 % de casos corresponden a pacientes cuyas edades están entre 70 a 90 años, y sólo el 14.14% de casos fueron en menores de 1 año y jóvenes.

Las muestras biológicas en las que aisló a *P. aeruginosa* productora de MBLs fueron: orina, aspirado bronquial, BAL, herida no operatoria, secreción otica, líquido de diálisis peritoneal y sangre; fue orina en la que se aisló el mayor número de casos: 46.15 %; en el Servicio de Medicina-1, se detectó más casos 30.76 %, seguido de Cardiología y UCI con 23.07 %.

Se detectó la enzima MBLs en cepas peruanas de *Pseudomonas aeruginosa* y se estableció la incidencia en 6.99 %, la cual es inferior a las reportadas por otros países, por lo cual se debe hacer estudios multicéntricos para establecer la incidencia real.

**Palabras Clave:** *P. aeruginosa*, Imipenem, Meropenem, MBLs, Discos de EDTA, Perú.

## SUMMARY

In the study, 186 samples of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to the Imipenem (IMP) and the Meropenem (MEM) or with Intermediate resistance to both antibiotic and one of them were collected in the Service of Microbiology of the Guillermo Almenara Irigoyen National Hospital - ESSALUD from the month of January to the month of October of the year 2008.

Using the Phenotypical Method of Double Disc Diffusion with Monodiscs of EDTA; 13 positive strains of *Pseudomonas aeruginosas* for MBLs were detected (6.99 % of the sampled strains): of them, the 53.85% of the synergy (effect of metal-enzyme) was present in the disc of Meropenem, the 30.75% was present in both discs (Imipenem and Meropenem) and only the 15.38% was present in the disc of Imipenem.

The 100% of the *P. aeruginosa* strains in which metal-enzyme was detected belonged to hospitalized patients and the 69.76% of them belonged to masculine sex. The 61.54 % of cases correspond to patients whose ages are between 70 to 90 years, and only the 15.38% of the cases were in minors of 1 year and young people.

The biological samples, in which the producing *P. aeruginosa* of MBLs was isolated, were: urine, inhaled bronchial, BAL, non operating wound, ear secretion, liquid of dialysis peritoneal and blood; but it was in the urine in that the greater number of cases was isolated the 46. 15 %. In the Service of Medicine-1 were detected mayor number of cases (23.07%) followed for Cardiology and UCI (23.07%).

The MBLs enzyme was detected in *Pseudomonas aeruginosa peruvian* strains. The incident was of 6.99% that is lower tanning the incident reported in other countries. For which Multicentral studies must be done for establish the real incident.

**Key words:** *P. aeruginosa*, Imipenem, Meropenem, MBLs, Discs of EDTA, Peru.

# I. INTRODUCCION

*Pseudomonas aeruginosa*, productora de metalo B-lactamasas (MBLs), se identificó por primera vez en Japón en 1991. Desde entonces, el fenómeno se observó en otras partes del mundo. Las cepas de *P. aeruginosa* MBLs positivas pertenecen a la clase B *Ambler* y tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de agentes B-lactámicos como penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas. Estas enzimas requieren zinc para actuar y se inhiben por quelantes de metales, tales como EDTA y compuestos tiol. Los genes responsables de la producción de MBLs forman parte de una estructura integral y se transportan esencialmente en plásmidos. Por lo general, las cepas de *P. aeruginosa* productora de MBLs tienen resistencia a diferentes grupos de antibióticos y ésta puede transferirse a distintos tipos de bacterias. Las MBLs adquiridas pueden clasificarse en 4 grupos según la estructura molecular: se las denomina IMP, VIM, GIM y SPM. Además, en función de sus secuencias, se han identificado 3 subclases de beta-lactamasas clase B. <sup>(6, 13, 35, 37)</sup>

*P. aeruginosa* productora de MBLs es responsable de epidemias hospitalarias en centros de III y IV nivel, lo cual manifiesta la importancia de las medidas de control adecuadas. Asimismo, fue responsable de infecciones graves, como septicemia y neumonía. Por lo general, la resistencia a carbapenemas se atribuye a la falta de permeabilidad por pérdida de porina OprD o a la producción de MBLs. En la actualidad no existen parámetros estandarizados para la detección de organismos productores de MBLs. El *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) estableció guías para la identificación de gérmenes productores de beta-lactamasas de amplio espectro y de MBLs; las mismas requieren pruebas de confirmación con cefotaxima y ceftazidima en forma aislada o en combinación con ácido clavulánico, así como con Imipenem y Meropenem en forma aislada o en combinación con discos de EDTA. <sup>(9, 10, 12)</sup>

Existen varios procedimientos fenotípicos para el reconocimiento de bacterias productoras de MBLs, todos se basan en la capacidad de quelantes o de compuestos tiol de inhibir la actividad de MBLs. Además, se dispone de métodos genéticos basados en reacción en cadena de polimerasa (PCR). <sup>(12, 31, 44)</sup>



En la presente investigación, se les detectó la enzima MBLs, con la metodología de Doble Difusión en Disco; para lo cual se utilizaron Monodiscos de EDTA y discos de Imipenem y Meropenem; esta es una metodología sencilla, rápida, económica y fácil de realizarlo, no requiere de insumos adicionales, ni de instrumental sofisticado; además se puede usar en laboratorios pequeños previo entrenamiento del personal responsable de hacerlo.

Los resultados de este trabajo son de mucha importancia porque se ha demostrado por primera vez en Perú, cepas de *Pseudomonas aeruginosa* portadoras de la enzima MBLs; así mismo se determinó la incidencia de estas enzimas en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* con sensibilidad intermedia y resistencia tanto a imipenem como meropenem colectadas de pacientes del Hospital Nacional Guillermo Almenara ESSALUD en el año 2008.

Propusimos como objetivo general y específicos a los siguientes:

### **OBJETIVO GENERAL:**

Detectar fenotípicamente la “Enzima Metalobetalactamasas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los Carbapenemas aisladas de pacientes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen – ESSALUD, por el método de doble Difusión en Disco usando Monodiscos de EDTA, en el año 2008.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

Determinar el Carbapenema en el que mas se manifiesta la presencia de la Metallo B-lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Determinar las muestras biológicas en las que se aislaron a *Pseudomonas aeruginosa* productora de Metallo B – lactamasas (MBLs).

Determinar si existe relación entre la edad del paciente y la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* productora de MBLs.

Determinar la Incidencia de MBLs en *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Almenara.

Implementar el método de Doble Difusión en Disco utilizando monodiscos de EDTA, para la detección de *Pseudomonas* productoras de MBLs en el Hospital Guillermo Almenara.

## II. MARCO TEORICO

### 2.1. ANTECEDENTES:

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacilo Gram negativa, no fermentador, oxidasa positivo, sintetiza sideroforos fluorescentes, presenta plásmidos, habita principalmente ambientes húmedos; puede ocasiona diversas patologías infecciosas en el hombre, como: Infección del tracto urinario (UTI), infecciones del tracto respiratorio (Neumonías), septicemia, infección por dispositivos intravasculares (catéteres), Infección de herida, etc.; en pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos, del ambiente hospitalario como de la comunidad. <sup>(8,9, 21, 22, 18)</sup>

Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, principalmente en el ambiente hospitalario se caracterizan por ser resistentes a los antibióticos, difíciles de tratar, con estancias prolongadas de hospitalización, con tasas cada vez mayores, con complicaciones severas, y muchas veces origina la muerte del paciente <sup>(11, 26, 20, 35, 41, 44)</sup>

El papel de *Pseudomonas aeruginosa* como agente patógeno responsable de infecciones comunitarias y, sobre todo, nosocomiales, está plenamente reconocido. Frecuentemente la elección del antimicrobiano más adecuado para tratar las infecciones que produce es problemático. Ello se debe básicamente a dos factores. *Pseudomonas aeruginosa* posee una elevada resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, lo que conlleva una clara reducción de las posibilidades terapéuticas. Por otro lado, es un microorganismo con extraordinaria capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, por lo general mediante mutaciones o adquisición de nuevos genes. Hay muchos factores que intervienen en el mecanismo de resistencia intrínseca como : la escasa permeabilidad de la membrana externa, presencia de bombas de expulsión, sobre todo MexAB-OprM, con capacidad para expulsar antibióticos Betalactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas y trimetoprim ; modificación del sitio de unión al antibiótico, modificación de rutas metabólicas internas y producción de enzimas como las

metalobetalactamasas que hidrolizan o degradan a los antibióticos de la serie de los carbapenemas: Imipenem (IMP) y Meropenem (MEM).<sup>(1, 6, 7, 13, 32, 46)</sup>

*Pseudomonas aeruginosa* constituye uno de los patógenos aislados con mayor frecuencia en pacientes hospitalizados. El tratamiento de las infecciones graves causadas por este microorganismo suele ser dificultoso debido a que, por un lado *P. aeruginosa* es naturalmente resistente a una gran variedad de antimicrobianos y, además, puede adquirir mecanismos de resistencia para prácticamente la totalidad de los antibióticos disponibles para su tratamiento. Por ello, cada vez es más frecuente la necesidad de emplear los carbapenemas, antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, con actividad contra la mayoría de los patógenos, pero con el riesgo de aparecer cepas resistentes que se refleja en el 26% de resistencia a ambos carbapenemas, informado por el programa Informático de Resistencia para el período 2002-2003.<sup>(1, 15, 17, 24, 32)</sup>

*P. aeruginosa* puede exhibir resistencia tanto en forma disociada a imipenem (IMP) o meropenem (MEM) como también a ambos carbapenemas simultáneamente. La resistencia sólo a MEM está frecuentemente asociada a la hiperproducción del sistema de eflujo constitutivo MexA-MexB-OprM; el mecanismo de resistencia a IMP más común es la impermeabilidad de membrana originada por el déficit de la proteína OprD sumado a la presencia de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas tipo AMP-C. En algunas ocasiones la expresión del sistema de eflujo denominado MexE-MexF-OprN podría estar implicado en la resistencia a IMP. La resistencia simultánea a ambos carbapenemas indica, o bien la co-existencia de dichos mecanismos, o la producción de enzimas con capacidad de hidrolizarlos, denominadas carbapenemasas. Estas pueden corresponder a serino-enzimas o metalo  $\beta$ -lactamasas (MBLs). Las serino-carbapenemasas son enzimas de clase A o D de Ambler y son responsables, en general, de la resistencia a carbapenemas en enterobacterias y *Acinetobacter spp.*, respectivamente.<sup>(2, 15, 17, 23)</sup>

Las metalobetalactamasas, son enzimas que pertenecen a la clase B de Ambler y al grupo 3 según la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros. Característicamente, estas enzimas son inhibidas por agentes quelantes de zinc, como el EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) y el SMA (mercaptoacetato de sodio). Han sido aisladas y reportadas en numerosos países, incluida la Argentina. Los genes que las codifican pueden estar localizados a nivel cromosómico o plasmídico. Estas enzimas hidrolizan

una gran variedad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas (1ª, 2ª, 3ª y 4ª generación) y carbapenemas. No actúan, in vitro, sobre aztreonam. El hecho de actuar sobre carbapenemas hace que su importancia clínica sea aún mayor, ya que estos antibióticos, debido a su amplio espectro de acción y a su estabilidad frente a la acción de enzimas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), son utilizados como último recurso para el tratamiento de infecciones causadas por bacilos Gram negativos resistentes a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Además, se han publicado diversos trabajos documentando la diseminación de este tipo de enzimas en el ámbito hospitalario, resaltando su importancia epidemiológica. Esto conduce a que la detección de enzimas metalo B-lactamasas sea determinante para dirigir el tratamiento óptimo de los pacientes y para controlar la diseminación de la resistencia. Sin embargo, los puntos de corte de los métodos habituales utilizados en la detección de esta enzima todavía no están estandarizados - De aquí la importancia y necesidad de contar con un método fenotípico, rápido, práctico y simple, para detectar microorganismos que posean estas enzimas. (1, 24, 28, 35, 46)

Las primeras metalobetalactamasas (metaloenzimas) del tipo VIM (clase B) se detectaron en un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en Verona (Italia) en 1997. Se denominaron VIM-1. Posteriormente se identificaron variantes de esta VIM-1 en Marsella (Francia), Grecia, Corea, Portugal, Japón y diferentes países de América del Sur. En España se descubrieron en el año 2002. Fue una metalobetalactamasa de tipo VM-2, codificado por un integrón de la clase I de un plásmido, en el año 2004 se detectada la metalobetalactamasa VIM-3; a la fecha muchos son los países que reportan los hallazgos de esta enzima. (2, 4, 3, 7, 15, 17, 35, 40, 44, 46)

En los últimos años se ha registrado a nivel mundial, especialmente en Europa, Asia, América Latina un notable incremento en el informe de nuevas MBLs y en la diseminación entre microorganismos relacionados e incluso no relacionados (45, 48). Sin embargo, en el Perú la presencia de estas enzimas hasta la fecha todavía no son detectadas ni reportadas, razón por la cual nos propusimos realizar un estudio en 186 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes o con sensibilidad intermedia tanto al Imipenem como al Meropenem, a fin de detectar la presencia de la enzima Metalobetalactamasa con una metodología simple, sencilla y económico utilizando

monodiscos discos de EDTA ; en cepas colectadas de pacientes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen de Lima –Perú, en el año 2008.

## **2.2. Género *Pseudomonas*:**

Las *Pseudomonas* son bacilos Gram, negativos, rectos o ligeramente curvos, móviles, no fermentadores de carbohidratos, oxidasa positiva, aerobios estrictos, algunas especies pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Sintetizan sideroforos fluorescentes de color amarillo- verdoso (piocianina y pioverdina), la degradación de los glúcidos lo realizan utilizando la ruta de: Etner Doudoroff y el ciclo de los Acidos Tricarboxilicos, produce un olor dulzón característico en cultivos; algunas especies sintetizan capsula de exopolisacarido que favorece la adhesión, la formación de biopelículas y protege de la fagocitosis, de los anticuerpos del complemento, además aumenta la patogenicidad; son muy resistentes a las condiciones adversas del ambiente y presenta plásmidos los cuales son responsables de la incorporación y desimanación de los factores de resistencia a los medicamentos, desinfectantes y a condiciones adversas del ambiente. <sup>(18, 20, 22, 36)</sup>

Las *Pseudomonas* son organismos ubicuos, se los aísla de diferentes ambientes como de suelos limpios o contaminados, de vegetales, de agua dulce como salada, de lugares húmedos, de jabones, soluciones líquidas; en general la mayoría de especies de este género son inocuas para el hombre; pero ciertas especies pueden ocasionar diversas patologías infecciosas tanto en pacientes con inmunidad normal o con inmunidad disminuida. <sup>(6, 15)</sup>

Las especies del género *Pseudomonas* tiene la propiedad de degradar infinidad de sustratos y de utilizar diferentes fuentes de carbono como nutrientes lo cual les permite colonizar ambientes y nichos ecológicos que difícilmente son colonizados por otros microorganismos; intervienen en la degradación y reciclaje de materia orgánica, contribuyendo de esta manera a mantener limpio y saludable el medio ambiente. <sup>(18, 20, 22, 34, 40)</sup>

### **2.2.1 - Ubicación Taxonómica del Género *Pseudomonas*:**

Según la clasificación filogenética de Carl Woese, a *Pseudomonas*, Taxonómicamente se clasificada de la siguiente manera: Dominio: *Bacteria*, Filo: *Proteobacteria*, Clase: *Gamma Proteobacteria*, Orden: *Pseudomonadales*, Familia: *Pseudomonadaceae*, Tribu: *Pseudomonadae*, Genero: *Pseudomonas*, Especie: *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>(18)</sup>

### **2.2.2 - Especies del Género *Pseudomonas*:**

Actualmente la clasificación para los miembros del género *Pseudomonas*, está basada en la homología de secuencias de ARN, donde el género *Pseudomonas* se ubica en cinco grupos: grupo I: grupos fluorescente y no fluorescente, grupo II, grupo III, grupo IV y grupo V, siendo las especies de importancia médica las siguientes: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. pútida*, *P. syringae*, *P. phaseolica*, *P. stutzeri*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. picketti*, *P. acidovorans*, *P. alcaligenes*, *P. veróna* y *P. montelii*.<sup>(20, 22)</sup>

### **2.3 - *Pseudomonas aeruginosa*:**

Es un bacilo Gram negativo, se encuentra en pares o formando cadenas cortas, aeróbico obligado, mide aproximadamente 0,5 a 1 µm de ancho por 3 a 4 µm de largo, posee un solo flagelo, algunas especies pueden tener hasta 2 a 3. Producen dos pigmentos de importancia clínica: piocianina (azul) y pioverdina (verde fluorescente), algunas cepas pueden producir además los pigmentos piorrubina (rojo oscuro), piomelanina (negro), crece bien a temperaturas entre 37 a 42 ° C y en diferentes medios de cultivo formando colonias lisas o mucosas de color verde o azul, rojo o negro, con olor a uva<sup>(18, 20)</sup>

En año 2000 se logro secuenciar el genoma de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de un paciente con Otitis Media fue la Cepa PAO1, tiene un solo cromosoma circular compuesto por 6.3 millones de pares de bases, el secuenciamiento fue hecho por la Fundación para la Fibrosis Quística de la Universidad de Washington y la

compañía Patho Génesis, el interés de estas compañías es fundamentalmente clínico ya que el objetivo principal es encontrar nuevos fármacos y otras herramientas para combatir las infecciones humanas, especialmente por *Pseudomonas*.<sup>(24, 4, 41, 46)</sup>

Presenta dos tipos de plásmidos, Catabólicos y de Resistencia a los antibióticos y metales pesados; los primeros son escasos en *P. aeruginosa*, pero los plásmidos de resistencia son comunes en las especies.

*Pseudomonas aeruginosa* representa un problema importante de salud en centros hospitalarios especialmente cuando se trata de pacientes inmunosuprimidos sobre todo aquellos con cáncer o quemados; pero también puede afectar a pacientes sanos y ocasionar Infección del Tracto Urinario (UTI). Infecciones del tracto respiratorio (Neumonías), septicemia, infección por dispositivos intravasculares, Infección de herida, etc.; en pacientes de la comunidad o del ambiente hospitalario.<sup>(1,26, 45)</sup>

Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no solo daño tisular extenso, si no también interfieren con el funcionamiento del Sistema Inmune. Entre las proteínas que intervienen en la infección por *Pseudomonas aeruginosa* tenemos exotoxinas. A y S; así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. Esta situación se complica por difícil que es tratar a *P. aeruginosa*, debido a que estas bacterias presentan una alta resistencia natural a diferentes antibióticos y desinfectantes.<sup>(26, 42, 46)</sup>

Existe un grupo poblacional vulnerable a la infección por *P. aeruginosa* formado por enfermos de fibrosis quística, *P. aeruginosa* coloniza muy eficientemente el tracto respiratorio de estos pacientes y a medida que progresa la infección se seleccionan cepas mucoides de la bacteria que producen grandes cantidades del exopolisacárido Alginato. Una vez que se establece una infección por cepas mucoides de *P. aeruginosa* en los pulmones de estos pacientes, ellos entran a la etapa terminal de la enfermedad, debido a que estas cepas no pueden ser eliminadas del pulmón y hasta ahora no existe tratamiento efectivo contra estas cepas mucoides.<sup>(17, 36, 41)</sup>

Por otra parte, en ambientes acuosos ésta bacteria se adhiere a las superficies produciendo una serie de agregados llamados Biopelículas; la formación de estos cúmulos de bacterias y material extracelular representa un problema de salud pública, debido a que contaminan dispositivos que se implantan dentro del cuerpo, como por ejemplo: dispositivos intrauterinos, catéteres, válvulas cardíacas. Las biopelículas también representan un problema en proceso de producción de diversas industrias, debido a que provocan corrosión y taponamiento de conexiones y filtros. <sup>(42, 44)</sup>

Así mismo esta bacteria representa un problema en la Industria Alimentaria, pueden descomponer los alimentos que se encuentran en refrigeración, debido a que presentan un metabolismo basal en estas condiciones y producen enzimas hidrolíticas, *P. aeruginosa*, de estos alimentos puede contaminar a pacientes oncológicos al ser consumidos mal cosidos o crudos, como las ensaladas de vegetales. <sup>(19, 20)</sup>

De acuerdo a distintas fuentes bibliográficas, *Pseudomonas aeruginosa*, es responsable del 17% de las neumonías asociadas a asistencia respiratoria mecánica, 11% de infecciones del tracto urinario, y 3.8% de bacteriemias primarias en las unidades de cuidados intensivos de adultos. Sin embargo en las unidades de pacientes quemados la *P. aeruginosa*, es causa del 21.5% de las neumonías; 20% de las infecciones urinarias y 9% de las bacteriemias primarias. <sup>(13, 14, 17,)</sup>

## **2.4 - *Pseudomonas aeruginosa* Multirresistente (PAMR):**

El termino de multirresistencia se emplea a utilizar a partir de los años 70 y fue aplicado a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y a *Streptococcus pneumoniae* con un perfil de resistencia a 2 o más de los agentes antibacterianos utilizados habitualmente en el tratamiento de las infecciones producidas por este microorganismo. Posteriormente el término fue aplicado a patógenos oportunistas que presentaban resistencia a 3 o más antibióticos. <sup>(13, 21, 23, 44)</sup>



En el año del 2002 Flamm y colaboradores, reportan multirresistencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* al observar que eran resistentes al menos a 3 de los antibióticos siguientes: amikacina, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, piperacilina, piperacilina – tazobactam, ticarciclina – clavulanato o tobramicina.

Posteriormente se definió a *Pseudomonas aeruginosa* Multirresistente (PAMR), como aquella *Pseudomonas* que muestran resistencia simultánea a cuatro antibióticos dentro de los cuales se incluye a: piperacilina o piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefalosporinas de cuarta generación, y ciprofloxacina. <sup>(44)</sup>

En el 2006 Falagas y Paterson definen a *Pseudomonas* multirresistente: PAMR, o PAMDR, según los siguientes criterios:

*Pseudomonas aeruginosa* resistente a >1, >2, o >3 “familias” de antipseudomónicos (cefalosporinas, penicilinas, carbapenemas, quinolonas, aminoglucósidos)

*P. aeruginosa* resistente a 3 de 4 antibióticos definidos (ceftazidima, imipenem, ciprofloxacino, y tobramicina)

*Pseudomonas* resistentes a una serie de atbs concretos (múltiples combinaciones)

## **2.5 - *Pseudomonas aeruginosa* Panrresistente (PAPR):**

Son cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que presenta resistencia in vitro a todos los antibióticos testados; o bien a todos los antibióticos probados menos a las polimixinas o son resistentes a todos los antibióticos Betaláctamicos incluyendo a las quinolonas.

Estas cepas en la actualidad están emergiendo en los hospitales principalmente en las unidades de cuidados intensivos y significa un problema tratarlas y un riesgo que se diseminen o transfieran el gen de resistencia a cepas sensibles. <sup>(6, 13, 24, 29)</sup>

## 2.6 - Mecanismos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*:

*Pseudomonas aeruginosa* es resistente, tanto de manera natural como adquirida, a un gran número de antibióticos (AB): como cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos <sup>(1)</sup>. Esto se debe a las características de su membrana celular que tiene propiedades excepcionales de impermeabilidad. La resistencia a los AB usualmente activos sucede en el medio hospitalario. Las cepas pueden transmitirse entre ellas el material genético que media la resistencia, incluso a partir de otras bacterias Gram negativas como las enterobacterias. Otro factor preocupante es la capacidad de *P. aeruginosa* de tornarse resistente en el curso del tratamiento antibiótico. Los mismos AB son capaces de inducir los mecanismos de resistencia que un aislamiento tiene latentes. Otras sustancias como el zinc, componente de una clase de catéteres urinarios, también inducen cambios moleculares que activan la resistencia a imipenem. <sup>(7)</sup> Se ha evidenciado que en 10.2% de los tratamientos para *P. aeruginosa* emerge una cepa resistente que antes del tratamiento era sensible. Esta inducción de resistencia varía dependiendo de cada antibiótico. Por ejemplo, ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación con actividad antipseudomonas, tiene el más bajo riesgo de inducir resistencia en bacterias previamente sensibles a ceftazidima; en contraste, imipenem presenta la más alta tasa de emergencia de resistencia después del tratamiento. <sup>(29, 37)</sup>

Lo preocupante, son las pocas opciones que quedan para el efectivo tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes. Los AB que se consideran con buena actividad son: las penicilinas antipseudomonas (piperacilina, ticarcilina, carbenicilina, azlocilina) asociadas a inhibidores de b-lactamasas, ceftazidima, cefepime, monobactámicos como aztreonam, carbapenémicos (imipenem y meropenem), quinolonas especialmente ciprofloxacina y aminoglicósidos. Sin embargo, ante el surgimiento de aislamientos multirresistentes a veces es necesario acudir a antibióticos que se consideraban fuera de uso por su alta toxicidad como las polimixinas. <sup>(39, 41)</sup>

Los principales mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* comprenden: presencia de  $\beta$ -lactamasas y alteraciones de la permeabilidad de membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembrana. <sup>(29, 43)</sup>

### 2.6.1 - $\beta$ -lactamasas:

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos, de esta manera destruyen el sitio activo del AB e impiden su actividad. Las  $\beta$ -lactamasas se caracterizan por su capacidad de inhibir determinados subgrupos de  $\beta$ -lactámicos, es por esto que algunas subclasificaciones las denominan, penicilinasas, cefalosporinasas o carbapenemasas, dependiendo de la familia de  $\beta$ -lactámicos que tenga mayor susceptibilidad a ser atacadas por la enzima. Así mismo, estas enzimas son susceptibles de ser inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el clavulanato, el sulbactam y el tazobactam, aunque no todas son susceptibles ni responden de igual forma a esta inhibición. <sup>(2, 3, 4, 21, 38)</sup>

*P. aeruginosa* posee dos clases de  $\beta$ -lactamasas: Amp-C y las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Amp-C, está codificada en el cromosoma de la bacteria y tiene la capacidad de ser inducida por los propios  $\beta$ -lactámicos, especialmente cefalotina y ampicilina. Cuando esto sucede, hay resistencia a penicilinas y cefalosporinas (ceftazidime, cefepime); el grado de resistencia, depende del grado de represión de la Amp-C. <sup>(19, 22)</sup>

El problema radica en que esta enzima, es inducida en cuestión de días, por tanto, antes del tratamiento, el  $\beta$ -lactámico parece servir, pero clínicamente el paciente no mejora y se descubre posteriormente la inducción completa de la enzima. <sup>(35, 45)</sup>

Las BLEE son codificadas por plásmidos, se adquieren mediante transporte de DNA extracromosomal y se manifiestan también por resistencia a penicilinas y a cefalosporinas. En enzimas llamadas carbapenemasas se evidencia resistencia a carbapenemas. <sup>(38, 40)</sup>

Las  $\beta$ -lactamasas más frecuentemente adquiridas por plásmidos son la PSE-1 y la PSE-4. Otras BLEE incluyen la PER-1 que confiere franca resistencia a ceftazidima pero que pierde su poder al adicionar clavulanato. TEM, SHV y OXA, son BLEE que generan resistencia a monobactámicos, penicilinas, cefalosporinas, pero respetan carbapenemas. Existen metalo  $\beta$ -lactamasas que tienen la capacidad de hidrolizar las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas pero no el aztreonam; estas son IMP y VIM recientemente descritas en Japón y Europa. <sup>(13, 17,23, 32, 36)</sup>

La resistencia mediada por este mecanismo se debe sospechar ante un antibiograma que revele resistencia a todas las penicilinas y cefalosporinas anti-pseudomonas <sup>(5)</sup>. La opción terapéutica en este caso son los carbapenemas, siempre que no se trate de una carbapenemasa. <sup>(10, 19, 29, 31)</sup>

# CLASIFICACION DE LAS B- LACTAMASAS

Clasificación de BUSH-JACOBY-MEDEIROS, 1995		Clasificación de AMBLER, 1989	Características Funcionales
Grupo Funcional	Subgrupos	Clase Molecular	
1		C	Las enzimas cromosómicas y plásmidiales confieren resistencia a los $\beta$ -lactámicos, excepto los carbapenémicos. Ellas no son inhibidas por ácido clavulánico
2		A, D	La gran mayoría de las enzimas son inhibidas por ácido clavulánico
	2a	A	Penicilinasa producida por Staphylococcus spp. y Enterococcus spp. confieren un alto nivel de resistencia a la penicilina
	2b	A	$\beta$ -lactamasas de espectro reducido en bacterias Gram-negativas. Incluye TEM-1 y SHV-1
	2be	A	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido confieren resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y monobactamas
	2br	A	$\beta$ -lactamasas derivados de la enzima TEM resistentes a los inhibidores de $\beta$ -lactamasas (IRT)
	2c	A	Enzimas que hidrolizan la carbenecilina
	2d	D	Enzimas que hidrolizan la cloxacilina (oxacilina); poco inhibidas por ácido clavulánico
	2e	A	Cefalosporinasas inhibidas por ácido clavulánico
	2f	A	Enzimas que hidrolizan los carbapenémicos con sitio activo serina, inhibidas por ácido clavulánico
3	3a, 3b, 3c	B	Metalo- $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a los carbapenémicos y todos los demás $\beta$ -lactámicos, con la excepción de los monobactamas. Ellas no son inhibidas por ácido clavulánico
4		ND	Enzimas no secuenciadas y que no son incluidas en otros grupos

Bush et al Antimicrob Agents Chemother 39 <sup>(6)</sup>: 1211-1233 1995

### 2.6.2 - Bombas de Expulsión:

Las bombas de expulsión son complejos enzimáticos de membrana, que expulsan de la célula, detergentes y sustancias antipáticas que de otra manera destruirían la bacteria. Antes de la era de los antibióticos, *P. aeruginosa* ya poseía estos complejos enzimáticos. Este complejo llamado MexAB-OprM, se compone de una proteína bomba en la membrana citoplasmática, una proteína ligadora en el espacio periplásmico y un canal de salida en la membrana externa (Figura1). Tiene la capacidad de expulsar al exterior de la bacteria y contra un gradiente de concentración,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim <sup>(1)</sup>. Estos sistemas de expulsión son los responsables de la "impermeabilidad" a la mayoría de los antibióticos.

Las bombas de expulsión, tienen también la capacidad de ser inducidas por antibióticos, especialmente ciprofloxacina <sup>(1, 46)</sup> además, los cambios mutacionales, incluso de una sola base nucleotídica en el ADN cromosómico de la bacteria, pueden sobreexpresar estas bombas. La sobreexpresión de MexAB-OprM, compromete la acción de quinolonas, penicilinas, cefalosporinas e incluso meropenem pero no imipenem. La sobreexpresión de la bomba, MexEF-OprN, confiere resistencia a quinolonas y algunos  $\beta$ -lactámicos, que incluyen meropenem e imipenem. <sup>(13, 32)</sup>

Esta última bomba tiene una importante particularidad debido a que su expresión está estrechamente relacionada con el gen Mex T, que también está involucrado en la mutación que origina la pérdida de la porina OprD como se verá mas adelante. La sobreexpresión de MexXY-OprM afecta a los  $\beta$ -lactámicos, las quinolonas, el meropenem y los aminoglicósidos sin afectar la acción del imipenem. <sup>(6, 7)</sup>

La resistencia mediada por bombas de expulsión se sospecha por un antibiograma que demuestra resistencia a las penicilinas y cefalosporinas antipseudomonas, que también afecta la susceptibilidad a meropenem, imipenem o aminoglicósidos dependiendo de la clase de bomba. <sup>(31, 34)</sup>

### 2.6.3 - Porinas de Membrana:

Las porinas son proteínas transmembranales que se ubican en la membrana externa de las bacterias y cumplen diversas funciones. OprD es una porina de membrana presente en *Pseudomonas aeruginosa*.

Su papel primitivo es permitir la captación pasiva de aminoácidos básicos a través de la membrana externa. Se sabe además, que es capaz de permitir la entrada de carbapenémicos, aunque no de otros  $\beta$ -lactámicos. La afinidad y la capacidad de difusión de imipenem a través de esta porina son casi 70 veces más altas que la de meropenem. El imipenem tiene la capacidad de seleccionar durante el tratamiento cepas que muestran mutaciones en la porina OprD, que demuestran disminución de la afinidad y el transporte de este antibiótico a través de esta proteína. Estas cepas mutantes muestran un aumento de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para imipenem, lo que las hace francamente resistentes a este carbapenéma. Con respecto a meropenem, estas cepas mutantes también han demostrado un aumento de la CIM a valores, que si bien no demuestran resistencia, si revelan disminución de la susceptibilidad. La resistencia franca a meropenem exige dos mecanismos de resistencia ya mencionados: la mutación del gen que codifica la porina OprD y la activación de bombas de expulsión que toman a meropenem como sustrato. La mutación del gen OprD se sospecha ante una cepa francamente resistente a imipenem con susceptibilidad reducida o preservada a meropenem y sin afectar a otros  $\beta$ -lactámicos, a menos que estén presentes otros mecanismos de resistencia. <sup>(17, 38, 44, 46)</sup>

### 2.6.4 - Modificación del Sitio Blanco:

El sitio blanco de los carbapenemas y de todos los B- lactámicos, son proteínas unidoras de proteínas de penicilinas (PUP), macromoléculas que forman parte de la membrana citoplasmática y participan en la síntesis de la pared bacteriana. Estas proteínas pueden sufrir modificaciones moleculares que disminuyen su afinidad por los B- lactámicos, pero que no afectan su actividad funcional: Aunque la producción de proteínas unidoras de penicilinas con baja afinidad por los B- latámicos no es un

mecanismo de resistencia común entre las bacterias Gram negativas, el número de reportes se ha incrementado en los últimos años. <sup>(13, 33, 40)</sup>

Recientemente en *A. baumannii* se ha descrito que la ausencia de dos proteínas fijadora de penicilina: la PUP 2a y la PUP 2b, se relaciona con resistencia de bajo grado a imipenem, meropenem o ambos. <sup>(40, 46)</sup>

## **2.7 - Carbapenemasas:**

Las Carbapenemasas son enzimas que hidrolizan a todos los antibióticos B-lactámicos, como penicilinas, cefalosporinas y a los carbapenemas; para ser activadas necesitan de un ión metálico; o de un grupo serina, según la clasificación de Buch, Jacoby y Medeiros se las ubica en el grupo 1, 2, 3 y según Ambler en la clase molecular A; B; C ; D ; pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico o por ácido etilenodiaminotetracético, se les encuentra en bacilos Gram negativos no fermentadores (*Pseudomonas*) y con poca frecuencia en las enterobacterias; a las carbapenemasas se las clasifica en dos grupos: Serino-carbapenemasas y Metallo B-lactamasas. <sup>(2, 3, 4, 7)</sup>

### **2.7.1 - Serino – Carbapenemasas:**

Necesitan de serina en el sitio activo para ser activadas, son enzimas de clase A, C y D de Ambler, son responsables de la resistencia a carbapenemas en enterobacterias y *Acinetobacter* spp., son sensibles al ácido clavulánico y resistentes al aztreonam. <sup>(2, 3, 5)</sup>

**Las serino – carbapenemasas clase A, tipo Sme, IMI – 1 y MMC- A:** comparten las siguientes características, poseen mayor capacidad hidrolítica a Imipenem que a Meropenem, confieren resistencia al Aztreonam, pero no a las cefalosporinas de tercera generación, son inhibidas por el ácido clavulánico, se encuentra en los cromosomas, se puede inducir y se ha encontrado en unas pocas cepas de enterobacterias. <sup>(2, 4)</sup>

**Las Serino-carbapenemasas del tipo KPC:** fueron descritas recientemente y hasta el momento todos sus genes codificadores se han encontrado en plásmidos, presentan



gran habilidad hidrolítica a aminopenicilinas, ureidopenicilinas, aztreonam y a los carbapenemas y baja actividad hidrolítica a cefalosporinas de tercera generación. <sup>(1, 47)</sup>

**Las Serino – carbapenemasas del tipo GES – 2:** aparece por sustitución sencilla de aminoácidos de GES – 1 que pertenece al grupo de B- lactamasas de espectro extendido no derivados del TEM o SHV. Con esta sustitución, la GES- 2 se convierte en una carbapenemasa y ha sido reportada en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en el África. <sup>(14, 24)</sup>

**Las carbapenemasas tipo serina de la clase D (oxacilinasas):** se han encontrado principalmente en *Acinetobacter baumannii*. El espectro de actividad entre todas las oxacilinasas es bastante similar, puesto que hidrolizan débilmente imipenem y meropenem, no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam a excepción de OXA 27 todas son penicilinasas con gran poder hidrolítico frente a oxacilina a excepción de oxa 27 que es resistente. Su actividad como carbapenemasas es pobre, pero ella se incrementa por otros mecanismos de resistencia presentes como: bombas de flujo o disminución en la permeabilidad ocasionada por porinas o modificaciones en las proteínas de unión a las penicilinas. <sup>(3, 14, 24)</sup>

### 2.7.2 – Metallo Beta- Lactamasas (MBLs):

**Las Metallo-Beta-Lactamasas:** son enzimas que pertenecen al Grupo 3 según clasificación funcional de Buch Jacoby y Medeiros, y a la Clase Molecular B según Ambler; estas enzimas son inhibidas por agentes quelantes de zinc, como el ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) y el SMA (mercaptoacetato de sodio), son sensibles al aztreonam. Tienen dos familias importantes la VIM y la IMP , poseen baja homología en sus aminoácidos ( 30% ), pero tienen propiedades similares, son transferibles, la mayoría se encuentra en genes casetes localizados en integrones tipo 1 y en ocasiones en plásmidos y transposones, habitualmente estas enzimas están asociadas con otros genes de resistencia ubicados en los mismos genes casetes lo cual le permite tener resistencia a múltiples antibióticos como: a los B- láctámicos ( oximiino, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemas), aminoglucósidos y quinolonas, presentan sensibilidad variable al aztreonam; el grado de resistencia al imipenem varía CIM entre 4mg/dl y 128 mg/dl. La resistencia a ceftazidima es de alto grado, con CIM

mayor 64 mg/dl. Actualmente se encuentran muy diseminada principalmente en *Pseudomonas* y *Acinetobacter* lo mismo que su distribución es a nivel mundial. <sup>(2, 3, 17, 43)</sup>

Las Metallo\_B\_Lactamasas químicamente son hidrolasas, formadas por dos subdominios, cada uno separado por una alfa – hoja y un par de hélices que caen hacia el exterior de cada una de ellas. Cada subdominio está dividido en dos sectores, el primer subdominio está formado por los sectores 1 y 2, el primer sector es muy conservado y está tipificado por una alfa - hoja que contiene un aspartato terminal. Este aspartato participa en la estabilización de las cargas positivas entre los sectores 1 y 2. El segundo sector es el más característico de la familia metaloenzimas, con actividad de glioxilasa alfa lactamasa: Este sector tiene una estructura HxHxDH, donde la primera H corresponde a un aspartato que se mantiene invariable en todos los miembros activos de esta familia: La segunda H es reemplazada por residuos ácidos en varios miembros de las flavoproteínas. Mientras que la tercera H es reemplazada por la arginina en las alfa lactamasas típicas, en este segundo sector se encuentra el sitio activo en el cual se produce la reacción de hidrólisis está formado por Zinc estabilizado por dos histidinas y fuertemente protegidas por una estructura muy conservada de aspartato. El segundo subdominio está formado por los sectores 3 y 4, el sector 3 se caracteriza por la presencia de una histidina, esta histidina actúa como un ligando coordinador de Zinc, sosteniéndolo en el sitio activo. El sector 4 es muy parecido al sector 3, presenta una histidina unida asociada a un Nitrógeno terminal, la histidina protege al sitio activo con actividad alfa lactamasa, además de interactuar con cargas negativas del sustrato. <sup>(2, 3, 4)</sup>

Las primeras Metallo B - Lactamasas (metaloenzimas) del tipo IMP -1 fue aislada en el Japón, la cual para el año 1996 estaba desimada entre bacilos gran negativos por todo el mundo, La metalobetalactamasas del tipo VIM (clase B) se detectaron en un aislamiento clínico de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en Verona (Italia) en 1997. Se denominaron VIM-1. Posteriormente se identificaron variantes de esta VIM en Marsella (Francia), Grecia, Corea, Portugal, Japón y diferentes países de América del Sur. En España se descubrieron en el año 2002. Fue una metalobetalactamasa de tipo VM-2, codificado por un integrón de la clase I de un plásmido, en el año 2004 se

detectada la Metallo-  $\beta$ - Lactamasa VIM-3; en el año 2006 se reportó el hallazgo de Metallo-  $\beta$ - Lactamasa en América Latina en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* del tipo IMP- 1 ; a la fecha muchos son los países que reportan los hallazgos de ésta enzima 28 países y 5 continentes). <sup>(2, 4, 7, 13, 23, 28, 42, 46)</sup>

## 2.8- Carbapenemas:

Los carbapenemas son antibióticos  $\beta$ -lactámicos derivados de la tienamicina, metabolito producido por *Streptomyces cattleya*, que se caracterizan por estar dotados de un gran poder bactericida, una concentración mínima bactericida (CMB) próxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI), elevada afinidad por las proteínas fijadoras de las penicilinas (*Penicilin-Binding-Proteins*-PBP), gran estabilidad frente a la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas clínicamente importantes y un perfil de seguridad similar al de otros  $\beta$ -lactámicos. <sup>(5, 9, 10)</sup>

El espectro de actividad frente a bacterias es el más amplio de todos los antibióticos betalactámicos, los cuales incluyen bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero no actúan sobre bacterias que se desarrollan intracelularmente como *Chlamydia*. <sup>(29) (44)</sup> Se administra solo por vía intravenosa, dado que su absorción por vía oral es muy poca. Se utilizan comúnmente en los hospitales para tratar infecciones severas. Sin embargo se han investigado formas nuevas de administración de estos antibióticos, incluyendo la vía oral.

El grupo esta formado por: Imipenem, Meropenem, Ertapenem, faropenem, Doripenem, Panipenem, Panipenem/Betaniprom.

La estructura básica de los carbapenemas, al igual que la de las penicilinas, consiste en un anillo  $\beta$ -lactámico, que le proporciona afinidad por las PBP, unido a un anillo de cinco miembros (tiazolidina). Difieren de ellas y se caracterizan químicamente por poseer un átomo de carbono que sustituye al azufre en posición C1 de la tiazolidina y un enlace no saturado entre las posiciones 2 y 3 del anillo pentamérico , anillo carbapenem, que amplía el espectro y aumenta la potencia. <sup>(41, 43)</sup>

El primer carbapenema comercialmente disponible fue imipenem-cilastatina, que por sus

características se convirtió en uno de los antimicrobianos más útiles en el tratamiento de múltiples infecciones graves, fundamentalmente en el ámbito nosocomial (infecciones polimicrobianas, causadas por bacterias multirresistentes etc.). En 1994 se introdujo, a nivel mundial, meropenem, que presenta las ventajas de ser estable frente a la dihidropeptidasa-I renal (DHP-I), por lo que no es necesario administrarlo junto con un inhibidor enzimático como la cilastatina<sup>3</sup> y muestra un excelente perfil de tolerancia ,Tiene menor poder inductor de  $\beta$ -lactamasas tipo I en enterobacterias y *P. aeruginosa* que imipenem. <sup>(41)</sup>

## **2.9 – Monodiscos De Acido Etilenodiamino Tetracético (EDTA):**

Estos discos sirven para detectar fenotípicamente la presencia de enzimas metalo B-betalactamasasa a partir de cepas de bacterias Gram negativas, especialmente de *Pseudomonas aeruginosa*; una prueba positiva se detecta por el agrandamiento del halo de inhibición de la cepa testada alrededor del disco de imipenem (10 ug) o meropenem (10 ug) hacia el disco de EDTA. (Efecto huevo). <sup>(25, 44,)</sup>

El, EDTA, es una gente quelante de Zinc, inhibe la acción de la enzima metalo B-lactamasa.

Los discos utilizados en el presente trabajo son de procedencia Argentina del laboratorio Britania, están compuestos por 372 ug de ácido etilenodiamino tetracético y por 900 ug de mercaptoacetato, están fabricados en papel filtro y tiene un diámetro de 6 mm. <sup>(12, 44)</sup>

### III. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 Fuente de Información:

Los datos fueron obtenidos de las fichas epidemiológicas y de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de la base de datos del Sistema automatizado de MicroScam así como de los resultados de las pruebas manuales realizadas para la detección de metalo B- lactamasas. Se imprimieron todos los resultados positivos para *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia tanto a imipenem o meropenem o con sensibilidad disminuida a los dos o a uno de los antibióticos; así como los resultados de las pruebas manuales de la metalo B- lactamasas, en el periodo de enero a octubre del año 2008.

#### 3.2 Cepas Bacterianas:

Un total de 186 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron recolectadas de diferentes muestras biológicas como: catéter endovenoso, orina, aspirado bronquial, esputo, lavado bronqueo alveolar (BAL), sangre, herida operatoria, líquido cefalorraquídeo, tejido, absceso, líquido biliar, líquido peritoneal y herida no operatoria, correspondiente a pacientes hospitalizados como a los de consulta externa del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, durante el periodo de Enero a Octubre del año 2008; las cuales fueron conservadas en agar soya tripticosa hasta el momento de realizar el test.

Las muestras biológicas en las que se aisló a las *Pseudomonas* fueron de pacientes de hospitalización y de consultorio de diferentes servicios del Hospital Guillermo Almenara, como: medicina, cirugía, cardiología, pediatría, urología, Unidad de quemados, UCI, emergencia, pediatría, traumatología, neurocirugía, neonatología y neumología.

Después de excluir los aislamientos duplicados (el mismo biotipo de *Pseudomonas*

*aeruginosa* con el mismo perfil de susceptibilidad aislados del mismo paciente en una mismo periodo de hospitalización o consulta externa y teniendo en cuenta los criterios de exclusión quedaron las 186 cepas con las cuales se hizo el presente trabajo.

### **3.3 Agentes Antimicrobianos:**

Los carbapenemas (imipenem y meropenem) evaluados son los que se encuentran liofilizados en el panel para bacterias Gram negativos urinarias (NUC 35) y para bacterias Gram negativos Sistémicos (NCC 32) para la identificación de bacterias por el método automatizado MicroScan ; los discos de carbapenemas para la prueba de Doble Difusión en Disco fueron de la marca Oxoid adquiridos de laboratorios comerciales.

### **3.4 Susceptibilidad Antibiótica:**

La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) fue determinada utilizando el Sistema automatizado MicroScan, teniendo en cuenta los puntos de corte recomendados en enterobacterias por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), tanto para Imipenem (IMP) como para Meropenem (MEM), fue sensible cuando se obtuvo un MIC menor o igual a 4 ug/ml, intermedio 8 ug/ml y resistente igual o mayor 16 ug/ml.

También se determino la Suceptibilidad por el Método de Difusión en Disco, con discos de IMP de 10 ug y de MEM de 10 ug de potencia, se tomarón en cuenta los puntos de corte recomendados por el CLSI para el IMP como para el MEM, fue sensible cuando los halos de inhibición fueron igual o mayor a 16 mm, Intermedio igual a 14 y 15 mm y resistente cuando los halos inhibición eran igual o menor a 13 mm. Antes de usar los discos se les hizo el control de calidad con La cepa ATCC 27853 de *P. areuginosa* cuyos halos cayeron dentro de los rangos establecidos por el CLSI (IPM 20 a 28 mm y MEM 27 a 33 mm).

### **3.5 Monodiscos de EDTA:**

Los discos de EDTA utilizados son de la marca Britania de procedencia Argentina y los resultados fueron leídos según lo dispuesto por el CLSI; cualquier agrandamiento del halo de inhibición del carbapenema hacia el disco de EDTA se considera positivo, es decir se evidenciaba la presencia de la enzima metalo B- lactamasa.

### **3.6 Detección de la Metallo B- Lactamasas:**

#### **3.6.1 Preparación del medio Mueller Hinton:**

El agar Mueller Hinton se preparó siguiendo la Norma Técnica N° 30 del manual de Procedimientos para la Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana por el Método de Difusión en Disco del Instituto Nacional de Salud, (altura 4mm y pH: 7.2 a 7.4 ) y las especificaciones del fabricante, se le hizo control de calidad del rendimiento y de la esterilidad. Los medios controlados se pusieron en bolsas plásticas selladas y se los guardó en refrigeradora a temperatura entre 4 °C a 8 °C. Hasta el momento de su uso.

#### **3.6.2 Rehabilitación de las Cepas de *Pseudomonas*:**

Las cepas de *P. aeruginosa* conservadas en Agar Soya Trypticase, fueron sembradas en Caldo Infusión Cerebro Corazón e incubadas a 35 °C por 18 horas; del caldo nutritivo se sembró por agotamiento en medio sólido de Agar MacConkey y se les incubó a 35 °C por 24 horas.

#### **3.6.3 Preparación del Inoculo:**

Se utilizó el método directo de inoculación a partir de colonias aisladas; del cultivo de la placa de Agar MacConkey con colonias de 24 horas se seleccionaron 3 a 4 colonias aisladas y se preparó una suspensión directa en Solución Salina Fisiológica (SSF) y se ajustó la turbidez al tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland.

#### **3.6.4 Inoculación de las Placas:**

Dentro de los 15 minutos de preparado el inóculo, se sembró en una placa de Mueller Hinton estriando con hisopo estéril en tres direcciones y por último se pasó tres veces el hisopo por el perímetro de la superficie del medio y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente a fin de que el exceso de humedad sea absorbido.

#### **3.6.5 Método de Detección de las Metallo B- lactamasas con Discos de EDTA:**

Se usó el Método de Doble Difusión en Agar Muller Hiltón según norma de CLSI; lo cual se basa en el método de Doble Difusión en Discos, según se describe a continuación.

Colocar un disco de EDTA en el centro de placa de Muller Hiltón inoculada con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* a testar.

Colocar los discos de Imipenem y Meropenem contrapuestos al disco de EDTA, a una distancia de 15 mm entre borde y borde; incubar las placas en posición invertida a una temperatura de 35°C por un tiempo de 24 horas.

#### **3.6.6 Lectura de las placas e Interpretación de los Resultados:**

La Lectura de la prueba se realiza con buena luz después de las 24 horas de incubación. Una Prueba Positiva consiste en la observación del agrandamiento de la zona de inhibición del desarrollo de la cepa testada alrededor de los discos de Imipenem o Meropenem hacia el disco de EDTA, a este efecto de agrandamiento comúnmente se le llama Efecto Huevo.

Se considera una prueba negativa cuando no hay Agrandamiento de la zona de inhibición del desarrollo de la cepa testada alrededor de los discos de Imipenem y Meropenem hacia el disco de EDTA; el resultado de estas lecturas fueron registradas en las hojas de trabajo de cada cepa bacteriana para su análisis posterior.



### **3.6.7 Conservación de Cepas Positivas:**

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* positivas a Metallo B - Lactamasas fueron sembradas en Caldo Glicerol y congeladas a menos 30 °C para realizar estudios de Genotipificación en un futuro posterior.

## **3.7 Procesamiento y Análisis de Datos:**

La información fue recogida de los informes de los resultados de los diferentes especímenes positivos a *Pseudomonas aeruginosa* y que cumplían los criterios de inclusión planteados, pertenecientes a pacientes hospitalizados y de consultorio colectadas durante el periodo de enero a octubre del 2008, fueron ingresadas en una base de datos, para lo cual se utilizó Microsoft Excel XP Profesional 2007.

### **3.7.1 Procesamiento de Datos:**

Para Digitación se utilizó el programa Microsoft Word XP Profesional 2007.

Para el Registro de Datos se utilizó Microsoft Excel XP Profesional 2007.

### **3.7.2 Análisis Estadístico:**

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 13.0, teniendo en cuenta que se valoraron variables cualitativas, se utilizó la prueba de Chi – Cuadrado.

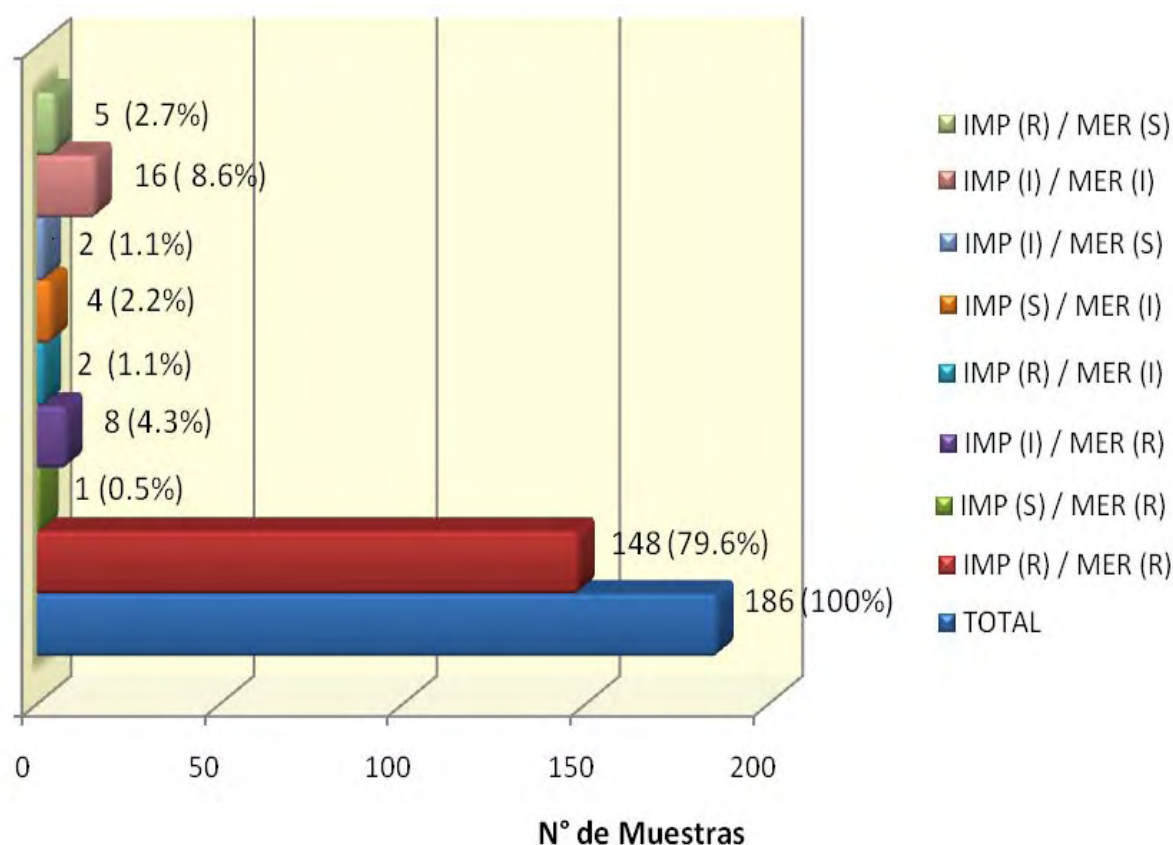
Un P menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

### **3.7.3 Presentación de Cuadros y Gráficos:**

Hoja de Cálculo Microsoft Office Excel 2007.

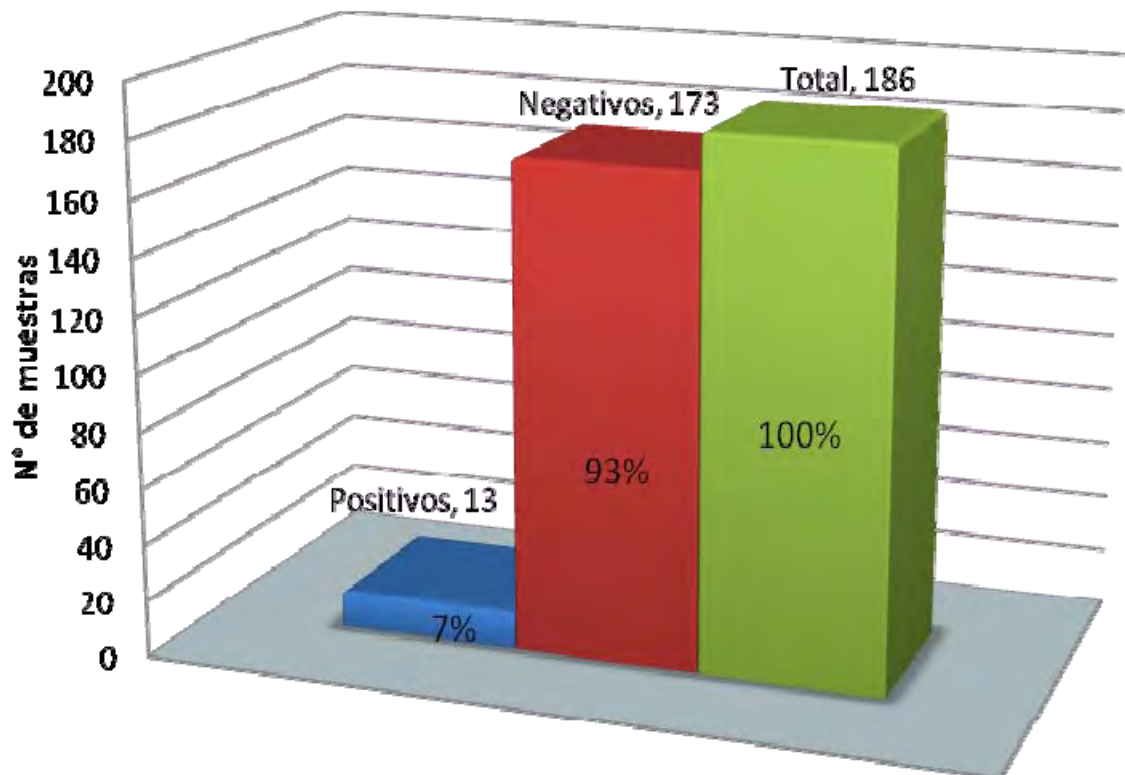
## IV- RESULTADOS

**GRAFICO N° 1: Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* su Resistencia y Susceptibilidad a Imipenem y Meropenem. Servicio de Microbiología, Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Enero a Octubre del 2008**



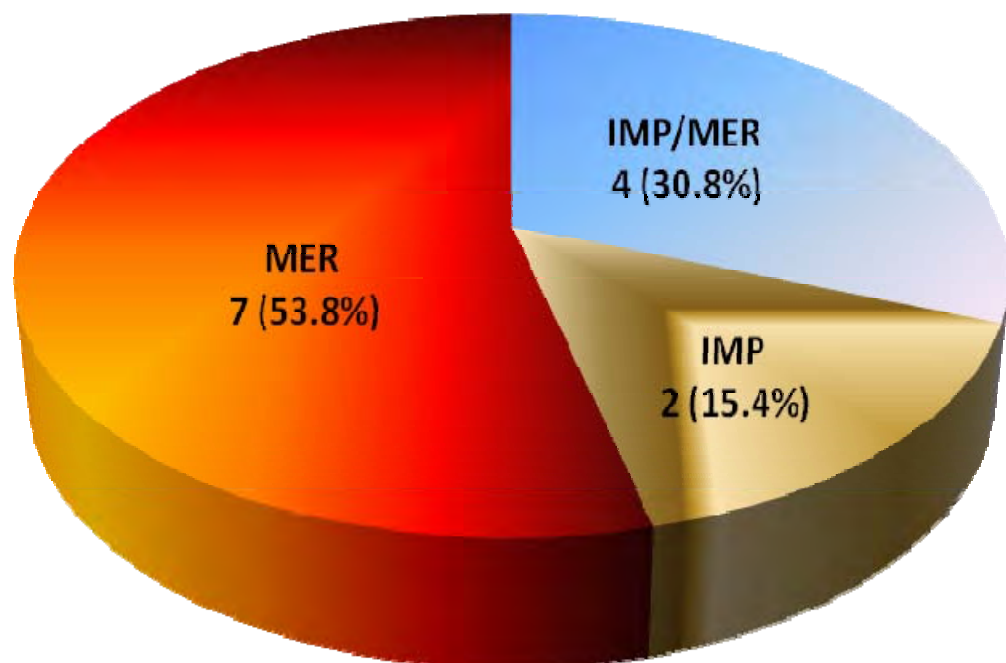
Del mes de enero al mes de octubre del año 2008 en el servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen se colectaron 186 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, siendo la mayoría de cepas resistencia tanto al Imipenem y Meropenem (148), con resistencia solo al IMP(5 cepas), solo al MEM<sup>(1)</sup> ; con resistencia intermedia a los dos antibióticos <sup>(16)</sup>, con resistencia Intermedia al IMP <sup>(2)</sup>, y al MEM <sup>(4)</sup>, ver Grafico N° 1.

**GRAFICO N° 2:** Presencia de MBLs en cepas aisladas de  
*Pseudomonas aeruginosa*. Servicio de Microbiología. Hospital  
 Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Enero a Octubre del 2008



A las 186 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se les hizo la Prueba de Detección de Metallo B- lactanasas por el método de Doble Difusión en Disco empleando monodiscos de EDTA, IMP y MEM; solo en 13 (7%) cepas se detectó la enzima MBLs. Ver Grafico N° 2

**GRAFICO N° 3: Detección de MBLs Según el Disco de Carbapenema Usado y el Disco de EDTA. Servicio de Microbiología. Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Enero a Octubre del 2008**



El 53.84% de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron la Metallo B- lactamasa en el disco de Meropenem, el 30.76 % de casos presentaron la MBLs tanto en el disco de Imipenem y Meropenem y solo el 15.40 de cepas de *Pseudomonas* presentaron la enzima MBLs en el disco de Imipenem. Ver Grafico N° 3

**FIGURA N° 1**



Fotografía N° 1, Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa peruanaa N° 75), Metallo B-lactamasa Positiva, donde se observa la interacción del Meropenem (MEM) con el disco de EDTA, nótese el ensanchamiento del halo de Meropenem en forma de copa hacia el disco de EDTA. Este carácter es indicador de la presencia de la enzima Metallo B-lactamasa en disco de MEM.

**FIGURA N°: 2**



**Fotografía N°: 2,** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa peruana n° 24), Metallo B-lactamasa Positiva, donde se observa la interacción del Imipenem y Meropenem (MEM) con el disco de EDTA, nótese el agrandamiento del halo de Imipenem (IMP) hacia el disco de EDTA y el ensanchamiento del halo de Meropenem (MEM) en forma de copa hacia el disco de EDTA. Este carácter es indicador de la presencia de la enzima Metallo B lactamasa tanto en disco del Imipenem como en el de Meropenem.

**FIGURA N°: 3**



**Fotografía N°3:** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa peruana N°129), Metallo B-lactamasa Positiva, donde se observa la interacción del Meropenem (MEM) con el disco de EDTA, nótese el agrandamiento del halo de Meropenem hacia el disco de EDTA. Este carácter es indicador de la presencia de la enzima Metallo B- lactamasa en el disco de MEM.



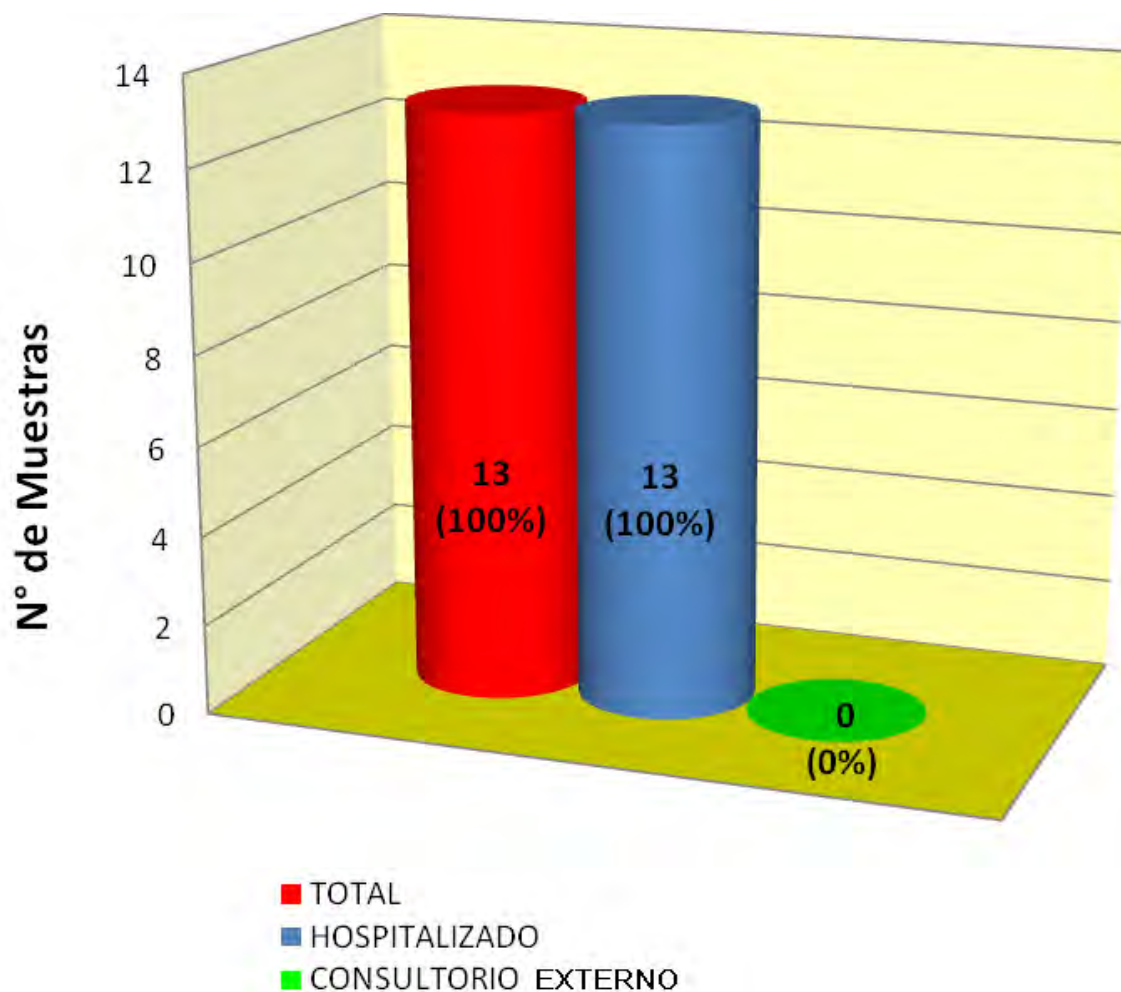
**FIGURA N°:4**



**Fotografía N°4:** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa peruana N°10) Metallo B-lactamasa Positiva, donde se observa la interacción del Imipenem (IMP) con el disco de EDTA, nótese el agrandamiento del halo de Imipenem hacia el disco de EDTA. Este carácter es indicador de la presencia de la enzima Metallo B-lactamasa en el disco de IMP. Este cultivo resultó ser in vitro sensible a los carbapenemas.

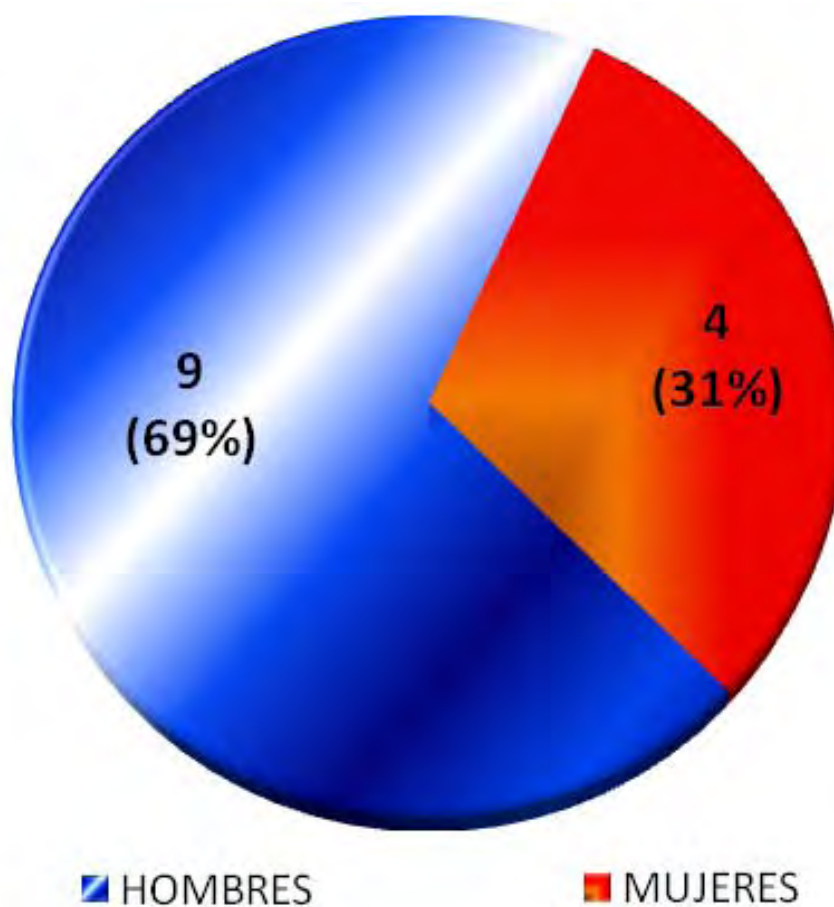


**GRAFICO N° 4: Distribución de *Pseudomonas aeruginosa* MBLs + según Procedencia del Paciente. Servicio de Microbiología. Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Enero a Octubre del 2008**



Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en las que se detectó la Enzima Metallo B-lactamasa, corresponden en su totalidad a pacientes hospitalizados (100 %). Ver Grafico N° 4

**GRAFICO N° 5:** Distribución de *Pseudomonas aeruginosa* MBLs +  
por Sexo del Paciente. Servicio de Microbiología. Hospital Nacional  
Guillermo Almenara Irigoyen. Enero a Octubre del 2008

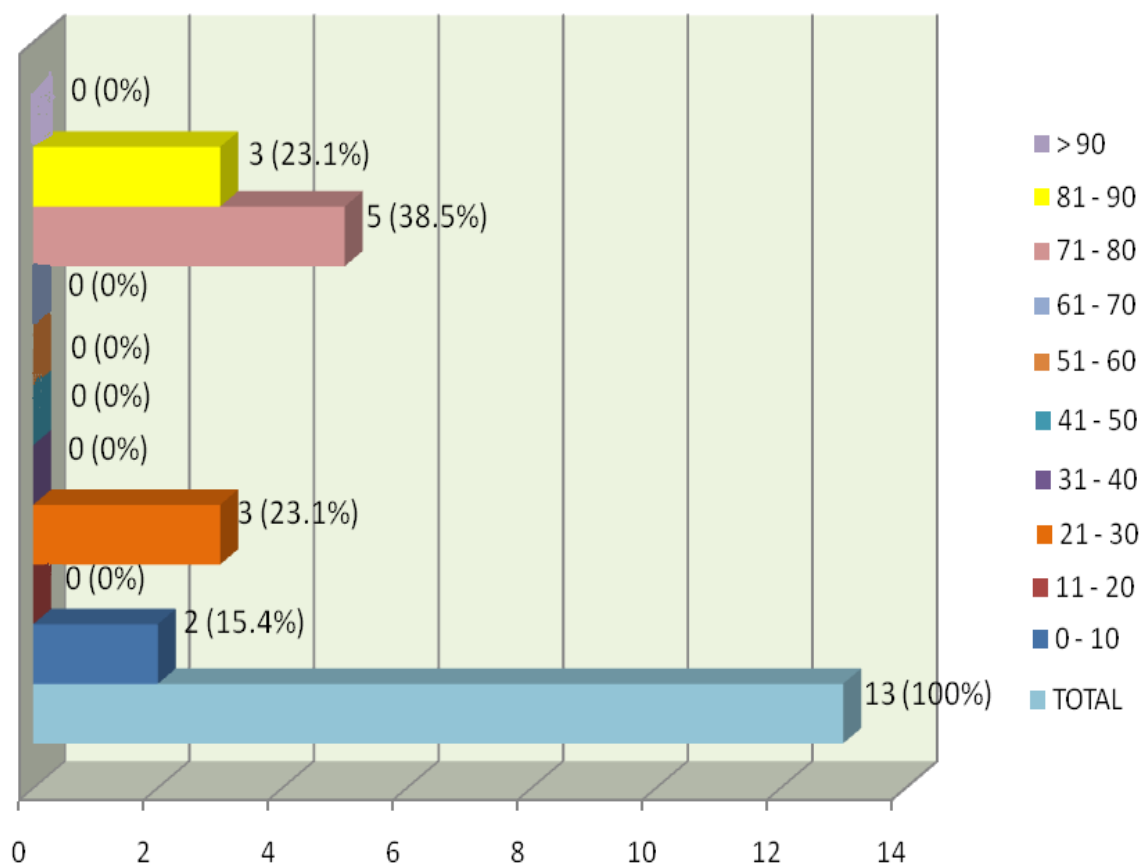


De las 13 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en las que se detectó la MBLs, el 69 % corresponde a pacientes del sexo masculino y solo 31 % corresponden a pacientes del sexo femenino, Ver Grafico N° 5.

**GRAFICO N° 6: Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MBLs +**

**Según la Edad del Paciente. Servicio e Microbiología. Hospital**

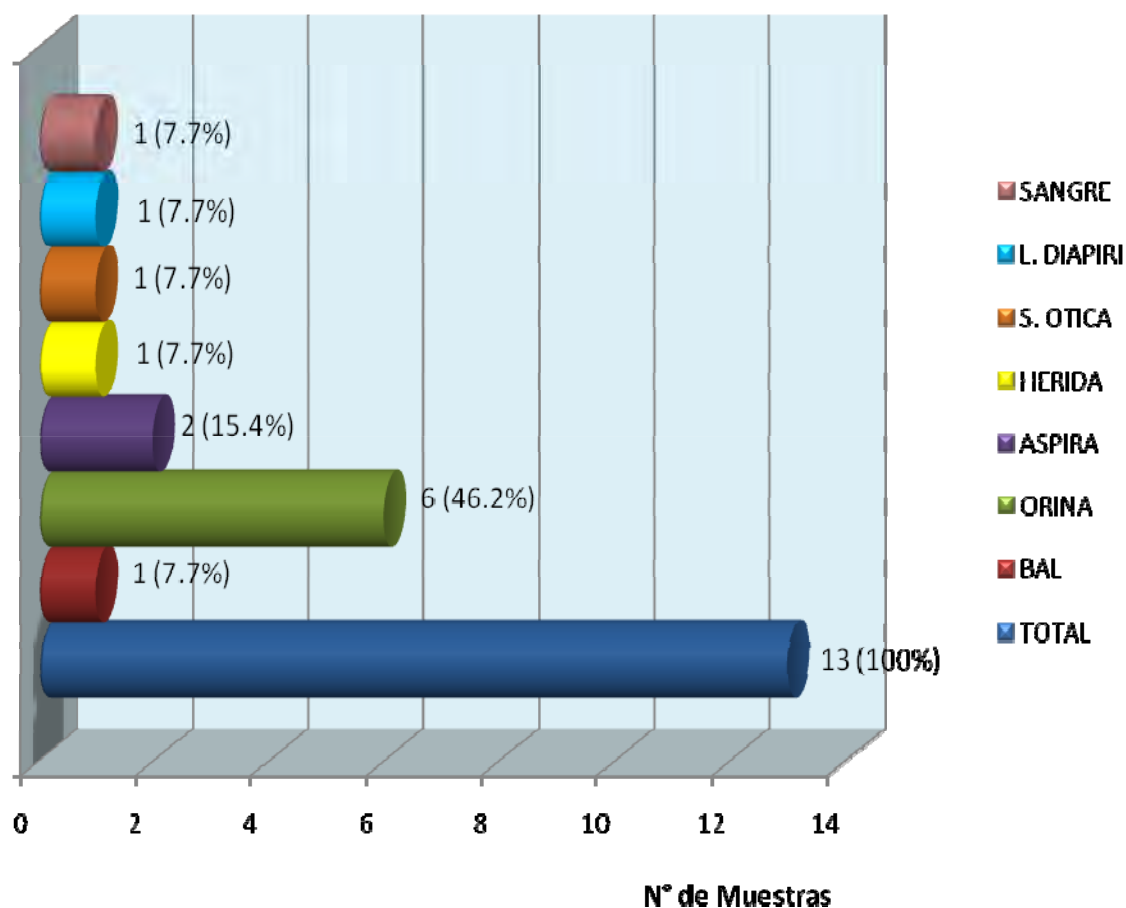
**Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Enero a Octubre del 2008**



Se detectó el mayor número de *Pseudomonas aeruginosa* MBLs Positiva en pacientes de 71 a 80 años de edad (38.5 %); el 23.1 % se detectó en pacientes de 81 a 90 años y de 21 a 30 años y solo el 15.4 % se detectó en pacientes menor de 10 años. Ver Grafico N° 6

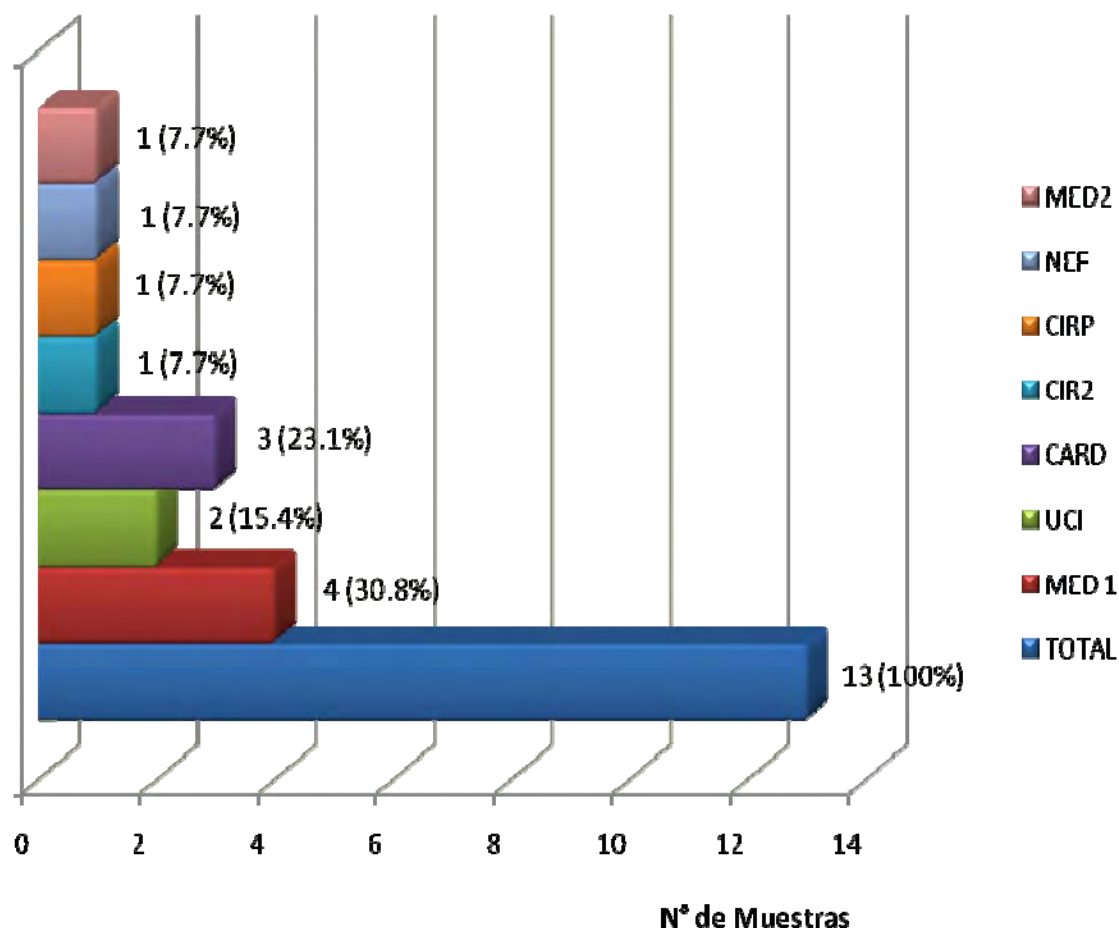
**GRAFICO N° 7: *Pseudomonas aeruginosa* MBLs + Según Muestra del Paciente.**

**Servicio de microbiología. Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Enero a Octubre del 2008**



Se detectó el 46.2 % de *Pseudomonas aeruginosa* MBLs + en muestras de orina, el 15.4 % a muestras de aspirado bronquial y el 7.7 % de casos positivos a muestras de Lavado Bronquio Alveolar, Herida no Operatoria, Secreción Otica, Liquido de Diálisis Peritoneal y Sangre respectivamente. Ver Grafico N° 7.

**GRAFICO N° 8: *Pseudomonas aeruginosa* MBLs + según procedencia del paciente. Servicio de microbiología. Hospital Nacional Guillermo Almenara. Enero a Octubre del 2008**



Los Servicios en donde se encontró *Pseudomonas aeruginosa* MBLs + fueron: Medicina 1, con 30.8 % de casos, Cardiología con: 23.8%, UCI con 15.4 % y Cirugía 2, Cirugía Plástica, Nefrología y Medicina 2 con 7.6%. Ver Grafico N°: 8

## V. DISCUSION

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno muy importante, por ser causa frecuente de muchas infecciones especialmente nosocomiales, así como por tener una elevada resistencia intrínseca a los antibióticos y una gran capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, ya sea por mutación o por adquisición de nuevos genes.<sup>(13, 15, 17, 35)</sup>

La Detección de MBLs en *Pseudomonas aeruginosa* a partir de muestras clínicas constituye un hecho observable en todos los países del mundo, lo cual denota una frecuencia creciente en los últimos años<sup>(46)</sup>. Estas cepas fueron responsables de epidemias de infecciones hospitalarias prolongadas graves<sup>(46)</sup>. Un estudio de casos y controles de Japón mostró que los pacientes infectados con cepas productoras de MBLs recibían generalmente múltiples antibióticos. Además, los fallecimientos relacionados con infección por *P. aeruginosa* productora de MBLs fueron más frecuentes en comparación con sujetos infectados por *P. aeruginosa* MBLs negativas<sup>(35, 45)</sup>. La aparición de bacterias MBLs en el ámbito hospitalario se asocia con un problema clínico importante, así como a programas de control de infecciones. Por estos motivos se requiere disponer de métodos diagnósticos confiables y precisos para identificación de estas cepas<sup>(12, 45)</sup>. En este estudio, utilizando una metodología sencilla la Doble Difusión en Disco, para lo cual se emplea Monodiscos de EDTA, se ha detectado MBLs en cepas peruanas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenemas (IMP y MEM) y con sensibilidad disminuida.

La presencia de las enzimas Metallo B- lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* ya han sido descritas en varios países de América Latina, éste es el primer estudio fenotípico que demuestra su presencia en especímenes biológicos, en el Perú.

A la vista de estos resultados, la incidencia de la enzima Metallo-B-Lactamasa en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenemas usando discos de EDTA, desde mes de enero a octubre del año 2008, en el Hospital Nacional Guillermo almenara Irigoyen fue del 6.99<sup>(7)</sup> %. Esta incidencia es bastante diferente a los que se

hallan en otros países europeos, ya que se habla de una incidencia de 1 % al 20 % del total de *Pseudomonas aeruginosas* y hasta de un 70 % entre las *P. aeruginosa* resistente a los carbapenemas. Probablemente se este infravalorando la presencia de metaloenzimas. En cuanto a pises de América Latina hay cierta similitud en los resultados; así en el trabajo realizado en Buenos Aires, Argentina por G. Pagniez, M Radice y colaboradores encontraron una incidencia de MBLs en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenemas de 11 %, en Chile en el estudio de Alfonso Pérez y colaboradores en encontraron una Incidencia MBLs en *P. aeruginosa* resistentes al Imipenem de 18.6 %. En Brasil de 15 %; y en realizados en Colombia por P. Martínez y colaboradores encontraron una incidencia de 14.5 %.

Si bien es cierto que los resultados obtenidos pertenecen solo al Hospital Almenara, y la situación epidemiológica es diferente para cada institución de salud del país, cabe resaltar que faltan estudios multicentricos para determinar la real incidencia de MBLs en *Pseudomonas aeruginosa* en el Perú.

Utilizando el Método Fenotípico de Doble Difusión en Disco con Monodiscos de EDTA; se llegó a detectar 13 cepas (7%) de *Pseudomonas aeruginosa* positivas para MBLs, en las cuales, el 53.8 % de la sinergia (efecto de la metaloenzima) se manifestó en el disco de Meropenem, el 30.8 % se manifestó en ambos discos ( Imipenem y Meropenem) y solo el 15.4 % se manifestó en el disco de Imipenem; estos hallazgos son similares a los de otros países, lo cual hace inferir que el Meropenem es un buen sustrato para la detección de la MBLs. Y que debe siempre usarse acompañado del Imipenem.

El 100 % de cepas de *P. aeruginosa* en las que se detectó las metaloenzimas fueron de pacientes hospitalizados, se sospecha que todavía no haya cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs en la comunidad; de estos aislados el 69 % fueron del sexo masculino; los pacientes en las que se detecto las *P. aeruginosa* productora de MBLs fueron niños y ancianos como población joven; el 61. 6% de los hallazgos

corresponden a pacientes cuyas edades son de 70 a 90 años, y solo el 15.4% de casos fueron menores de 1 año.

Las muestras biológicas en las que aisló a *P. aeruginosa* productora de MBLs fueron: orina, aspirado bronquial, BAL, herida no operatoria, secreción ótica, liquido de diálisis peritoneal y sangre, pero fue la orina en la se aisló el mayor número de casos: 46.2%; fue el Servicio de Medicina-1 donde se detecto el mayor número de casos 30.8 %, seguido de Cardiología 23.07 %, además de UCI, Cirugía Plástica, Cirugía General, Nefrología y Medicina-2.

La incidencia y la detección de las Metallo B- lactamasas responsables de la resistencia a los carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa* es diferente en cada región del mundo: el abuso de la administración de los B- lactámicos y de los carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa* es un factor importante en la generación y selección de organismos multirresistentes, que en el futuro limitará la elección de esquemas terapéuticos para el tratamiento de infecciones agudas.

Finalmente debemos de continuar buscando MBLs en *Pseudomonas aeruginosas* resistentes a los carbapenemas o en aquellas *Pseudomonas* que muestren sensibilidad solo a estos antibióticos, especialmente en muestras de orina y de vías respiratorias; además de método del de Difusión por el Mono disco de EDTA se debe comparar y utilizar otros métodos fenotípico como el Método de EDTA, por D-Test, y la Metodología recomendada por el CLSI. A fin de mejorar la sensibilidad y tener mayor porcentaje de detección de MBLs. Se recomienda que todas las cepas no susceptibles o resistentes a Imipenem o Meropenem sean evaluadas en forma rutinaria para determinar la posible producción de MBLs mediante el sistema de rastreo con discos con EDTA. La confirmación mediante PCR constituye un paso posterior importante, dado que el estudio antes señalado puede asociarse con resultados falsos positivos. Además, permite definir el tipo de MBLs y los posibles mecanismos participantes en la diseminación de la resistencia. La detección rutinaria de MBLs garantizará la atención óptima del paciente y la introducción oportuna de medidas de prevención.



## VI. CONCLUSIONES

- 1- De las 186 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes tanto al Imipenem como al Meropenem o con susceptibilidad disminuida, se pudo detectar en 13 (6.99%) de ellas la enzima Metallo B- lactamasa por el método fenotípico de Doble Difusión en Disco usando Monodiscos de EDTA, IMP y MEM.
- 2- El mayor porcentaje de la MBLs, se manifestó en el Disco de Meropenem: 53.8 % y la menor cantidad en el disco de Imipenem: 15.4 %
- 3- 100 % de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados tenían la enzima metalo B- lactamasa.
- 4- 61.6% de cepas de *Pseumononas aeruginosa* productoras de MBLs proceden de pacientes de 71 a 90 años edad, 23.1% de pacientes de 21 a 30 años y 15.1% de pacientes menores de 1 año de edad.
- 5- En orina se detectó el mayor número de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs, 46.2 % (6 cepas), seguido de aspirado bronquial con 15.4% (2 cepas).
- 6- Fue el Servicio de medicina-1 en el cual se aislaron la mayor cantidad de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs. 30.8. %, seguido de Cardiología con 23.07 %.
- 7- Se llegó a establecer la detección fenotípica de las MBLs en el Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara por la Metodología de Doble Difusión en disco, para lo cual se utiliza Monodiscos de EDTA, Imipenem y Meropenem.

## VII. BIBLIOGRAFIA:

1. Alfonso Perez I, Patricia Garcia C, Helena Poggi M, Stephanie Braun J, Claudia Castillo V, Juan Carlos Ramon, Marcela Lagos.; Eliana Romero O, Lorena Porte T, Jaime Labarca L, Gerardo Gonzales R (2008). Presencia de Metallo B- lactamasa en *P. aeruginosa* resistente al Imipenem – revista Médica Chilena pp: 423 - 432.
2. Ambler RP (1980). The structure of beta-lactamases – Philosophical transactions of the Royal society of London: Serie B. Biological sciences pp: 289 - 321 - 331.
3. Ambler R, Coulson A, Frère J, Ghuysen J, Joris B, Forsman M (1991), *et al.* A standard numbering scheme for the class a  $\beta$ -lactamases. Biochem J.; pp: 276: 269 - 72.
4. Bush K, Jacoby G, Medeiros A (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother; pp. 39: 1211-33.
5. Bradley J.S., Garau J., Lode H (1999)., *et al.* Carbapenemas in clinical practice: a guide to their use in serious infection. Inter J Antimicrob Ag. pp: 93-100.
6. Cardoso, O, Leitaao, R, Figueiredo, A (2002). Metallo – B- Lactamase VIM 2 In Clinical isolates of *Pseudomona aeruginosa* from Portugal. Microb Drug Resist pp : 93 - 97.
7. Castanheira M, Toleman M, Jones R, Schmidt F, Walsh T (2004). Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub> encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother, pp: 48: 4654-61.
8. Celiz Eduardo (2002) - Determinación de la Susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* comparando dos métodos: MicroScam versus dilución en Disco Kirby Bauer- Hospital Guillermo Almenara - Lima – Perú.
9. Consenso sobre criterio de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad en los BNNF de importancia clínica. Subcomisión de Antimicrobianos de SADEBAC, Asociación Argentina de Microbiología- año 2004.

10. XVII Curso Intensivo de Actualización en antimicrobianos “Dra. Alicia Rossi”, XII Curso Latinoamericano de Actualización en Antimicrobianos (2003). Servicio de Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Doctor Carlos G. Malbran”.
11. Erika Cecilia Agurto Lescano (2007). Estudio Comparativo de la Correlación Antibiótica en Hemocultivos de *Escherichia coli* y *Klebsiella especies* productoras y no productoras de B- lactamasas de Espectro Extendido en el Hospital Nacional Guillermo almenara en el periodo 2005 – 2006. Lima.
12. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo Beta-Lactamase Producing Isolates of *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp*. K. Lee, Y.S. Lim, D. Yong, J.H. Yum and Y. Chong (2003). Journal of Clinical Microbiology, pp. 4623 - 4629.
13. G. Pagniez, M. Radice, A. Cuirolo, O. Rodríguez, H. Rodríguez, C. Vay, A. Famiglietti, G. Gutkind (2006) - Prevalencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemas en un Hospital Universitario de Buenos Aires - Rev. Argent. Microbiol. v.38 n.1 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
14. García Sanchez E., Fresnadillo Martínez M.J., Blazquez de Castro A.M (1998). Carbapenemas. Medicine; 7(80):3728-3735.
15. Gutierrez-Urbon O., Requena-Rodriguez M.J. Diaz-Antolin P., Oliver-Palomo A. (2005) Aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de carbapenemasa (VIM-2) y de *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasa de espectro extendido (SHV-2) en una ulcera perianal de un paciente hematologico. Enferm Infecc Microbiol Clin. Pp: 23(9):574-5.
16. Hellinger W.C., Brewer N.S (1999). Carbapenemas and Monobactam: Imipenem, Meropenem, and Aztreonam. Mayo Clin Proc. pp: 74:420-434.
17. Ibañez A, Fález Y , Martín E , Santa María A, Rueda I ( 2004) , otros – Incidencia y Mecanismos de Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a Carbapenemas. Hospital Materno Infantil de Malaga – España.

18. Jawetz, Melenick y Adelberg (2005), Microbiología Médica Editorial Manual Moderno.
19. Jordi Vila Francesc Marco (2002) - Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gram negativos no fermentadores - Enferm Infecc Microbiol Clin.pp: 20:304-12.
20. Kiska DL, Gilligan PH (1999). *Pseudomonas*. En: Murray PR, Ed. Manual of clinical microbiology. 7<sup>th</sup> ed. Washington, DC: ASM Press; pp: 517.
21. Khezam, Yuli, Velasquez, Mariel. Caracterización Genotípica de cepas de *Pseudomonas*
22. Koneman Allen, Dowell, Janda, Sommeres, Willans – Diagnostico Microbiológico 5
22. Lagatolla, C, Tonin E.A -Montin Bragadin, C (2004) – Endemic Carbapenemase resistant *P. aeruginosa* acquired Metallo – B- Lactamase Determinants in European Hospital: Emergen Infect Dis. pp. 535 – 538.
23. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning (1999) and characterization of bla VIM, a new integron-borne metallo $\beta$  - lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother. Pp: 43:1584-90.
24. Lee, K, Lim, Y, S, Yon J.(2003), Evaluation of the Hodge test and the Imipenem EDTA. Double disk synergy test for differentiating Metallo – B- Lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp* J. Clinical Microbiol, pp: 41: 4623 – 4629.
25. Lopez de Lama, Luis Antonio (2000). Factores de Riesgo Asociados a la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* Multirresistente en pacientes Hospitalizados Hospital Nacional Eggerdo Rebagliati Martins.
26. Luis Torres (2004), Interpretaciones de relevancia en el antibiograma de los Gram negativos Escuela de Bioanálisis Caracas Venezuela - BOLETÍN No. 01 .
27. Martinez Pedro, Mercado Máximo, Mattar Velilla Salim (2005), *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productores de metalo- B- lactamasas en el principal hospital de Cordova, infectio, pp: 9(1): 6 – 15.
28. Mesa Española de Normalizacion de la Sensibilidad y Resistencia a los

- Antimicrobianos ( MENSURA )- Recomendaciones del Grupo MENSURA, para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. Rev. Española de Quimioterapia, 2000, 13: 73.
29. Miró E, Navarro F, Gómez L, Pericas R, Sánchez F, Mirelis B (2004), et al. Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa*: seguimiento epidemiológico desde 1996. XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Bilbao,. Comunicación 444. p. 157.
  30. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document. M100 -14 Wayne. PA: 2004, 24: 1.
  31. Pagniez G, Rodice M, Curiolo A, Rodriguez O, Rodriguez H, Vay C, Famiglietti A, Gutkind G. (2006) - Prevalencia de metalo- B- lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenemas en un hospital universitario de Buenos Aires – revista argentina de Microbiología. Pp: 38 (1), 33 – 7.
  32. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Ninth Edition, Volume 26 Number 1, January 2006, NCCLS Document M2- A9.
  33. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, Disk Diffusion, Volume 27 Number 1, January 2007, NCCLS M100-S17.
  34. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L (2005) y colaboradores-Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo-Beta-Lactamases in a Large Centralized Laboratory-Journal of Clinical Microbiology pp: 43(7):3129-3135,.
  35. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (2000), Ed. Principles and practice of infectious diseases. 5<sup>th</sup> ed. Filadelfia, (PA): Churchill Livingstone, pp: 2310.
  36. Prats, G. Miro, E, Mirelis, B, Poriel, I, Bellais, S, Nordmann P (2002). First isolation of Carbapenem Hydrolyzing beta- lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain Antimicrob agents Chemother, pp: 46 : 932 – 933.
  37. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD (2000), et al. Characterization of VIM-2, a Carbapenem hydrolyzing metallo  $\beta$  - lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical

- isolate in France. Antimicrob Agents Chemother, pp: 44:891-97.39.
38. Regnar Norrby S (1995). Carbapenémicos. Clin Med NA. Tratamiento antimicrobiano: Parte II. Traducido al español. Ed. Interamericana, pp: 4: 731-43.
  39. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R (2000), et al. Characterization of the Metallo  $\beta$ -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. Antimicrob Agents Chemother. Pp: 44: 1229-35.
  40. Sánchez, S. Salso, E. Culebras, J. J. Picaso (2004) – Resistencia a los Carbapenemas por metaloenzimas en aislamientos clónicos de *Pseudomonas aeruginosa* – Revista Española de Quimioterapia, volumen 17 (Nº): 336 – 340.
  41. Suárez Carlos José, Kattán Nicolas, Guzman Ana María, Villegas María Virginia (2006). Mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su Prevención y Control. Infecto, 10 (2): 85
  42. Tato M, Valverde A, Coque TM, Canton R (2006). *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de PER-1 en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. Pp: 24(7): 472.
  43. Torres, Luis<sup>1</sup>; González, Andreina<sup>2</sup>; Sanoja, Yubia<sup>2</sup>; Calvo, Alberto<sup>3</sup> (2005); y otros- Detección fenotípica de metalo  $\beta$ -lactamasas en bacilos Gram negativos resistentes a Carbapenemas, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela -XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología.
  44. Toleman M, Simm A, Murphy T, Gales A, Biedenbach D, Jones R (2002), et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother, pp: 50: 673-9.
  45. Watanabe M., Iyobe S., Inoue M (1999). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother; 35: 147-51.
  46. Yan. J.Y. Hsueh P, Y, W (2002). Metallo-  $\beta$ - Lactamasa in Clinical *Pseudomonas* Isolates in Taiwan VIM – 3<sup>a</sup> novel variant of the VIM- 2, enzyme antimicrob agentes Chemother, pp : 45, 2224 – 2228.

47. Yong D, Lee, K, Yum JH, Shin HB, Russolin GM, Chong Y (2002). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp*. J Clin Microbiol; pp: 40: 3798-3801.
48. Yatsuyagani, J, Saito, S, Harata S 1 (2004), Class Integron Containg Metallo  $\beta$ -Lactamasa gene bla VIM 2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain isolated in Japan. Antimicrob Agents Chemother, pp: 48: 626 – 628.

## **APENDICE**

**FOTOGRAFIAS. DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* POSITIVAS A  
METALO B- LACTAMASAS: MBLs.**

**CUADRO: CONTENIENDO INFORMACIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas  
aeruginosa* EN LA DETECCION DE METALO B- LACTAMASAS: MBLs.**



**Fotografía N° 1: Presencia de MBLs en el disco de IMP y MEM**



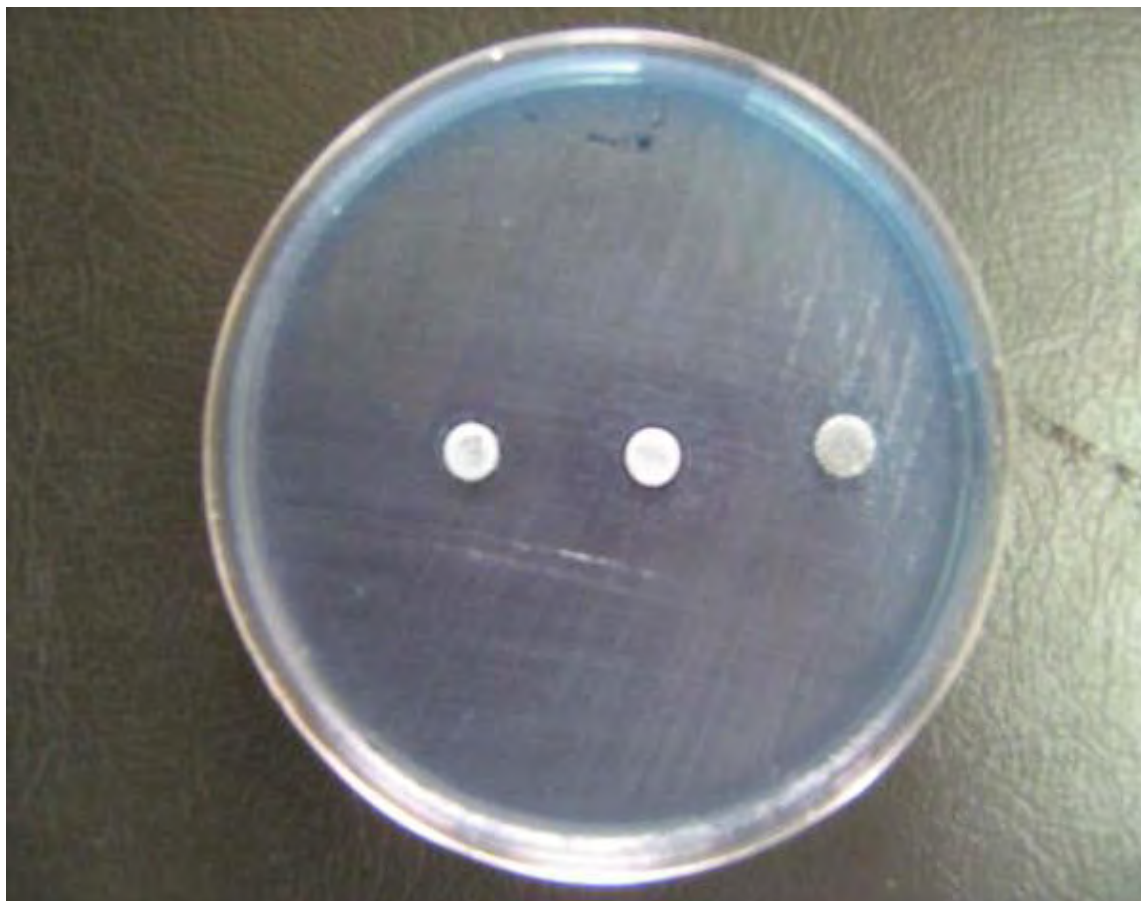
**Fotografía N°4:** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa peruana N°127) Metallo- B- Lactamasa Positiva, donde se observa la interacción del Imipenem (IMP) y del Meropenem (MEM) con el disco de EDTA, nótese el agrandamiento del halo de MEM hacia el disco de EDTA. Y de la presencia de un puente de inhibición de disco de IMP hacia el disco de EDTA. Este carácter es indicador de la presencia de la enzima Metallo B- lactamasa en el disco de IMP y MEM.

**Fotografía N° 2: Presencia de MBLs en el disco de MEM**



**Fotografía N°4:** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa peruana N° 150) Metallo- B- lactamasa Positiva, donde se observa la interacción del Meropenem (MEM) con el disco de EDTA, nótese el agrandamiento del halo de MEM hacia el disco de EDTA. Este carácter es indicador de la presencia de la enzima Metallo B- lactamasa en el disco de MEM. Esta cepa resultó ser sensible in vitro a los carbapenemas (IMP y MEM).

**Fotografía N° 3: Ausencia de la enzima MBLs**



**Fotografía N°4:** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa peruana N° 71) Metallo B- lactamasa Negativa, donde no se observa ninguna interacción tanto del disco de Meropenem (MEM) como con el de IMP hacia el disco de EDTA.

#### Fotografía N° 4: Ausencia de MBLs



**Fotografía N°4:** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa peruana N° 73) Metallo B-lactamasa Negativa, donde no se observa ninguna interacción tanto del disco de Meropenem (MEM) como con el de IMP hacia el disco de EDTA.

## CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* QUE TIENEN MBLs

Enero – Octubre 2008

### Hospital Nacional Guillermo Almenara

ITEM	N° CEPA	TIPO DE MUESTRA	SERVICIO	SEXO	EDAD	MS/IMP	MS/MER	SM/IM	SM/MER	MBLS	MBLS	MBLS
										IMP/MER	IMP	MER
1	10	BAL	MED - 1	F	79	R > 8	R > 8	S(29mm)	S(17)	-	+	-
2	24	ORINA	MED - 1	M	27	R > 8	R > 8	R(6)	R(6)	+	-	-
3	29	HERIDA NO OPERA	CIR - 2	M	88	R > 8	R < 4	R(6)	S(20)	-	-	+
4	40	ORINA	MED - 1	F	79	R > 8	R > 8	S(32)	S(32)	-	-	+
5	67	ORINA	UCII	M	71	I > 16	S < 4	S(25)	S(39)	-	-	+
6	75	SEC. OTILA	UCII	M	32	R > 8	R > 8	S(19)	S(20)	+	-	-
7	86	ORINA	MED - 1	F	87	R > 8	R > 8	R(6)	R(6)	-	+	-
8	127	ORINA	CARD	M	22	R > 8	R > 8	S(34)	S(36)	+	-	-
9	129	ASP. ENDOTR.	MED - 2	M	78	R > 8	R > 8	R(8)	S(18)	-	-	+
10	150	L. DIALISIS P.	NEF	M	78	I > 18	S < 4	S(20)	S(26)	+	-	-
11	162	SANGRE	CARDIO	M	<1	R > 8	R > 8	S(27)	S(36)	-	-	+
12	165	ASP. ENDOTR.	CIRP	F	<1	I > 16	S < 4	S(27)	S(36)	-	-	+
13	170	SANGRE	CCCU	M	83	R > 8	R > 8	R(8)	R(6)	-	-	+